



Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs : texturation par détente instantanée contrôlée (DIC)

Bouthaina Ben Amor

► To cite this version:

Bouthaina Ben Amor. Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs : texturation par détente instantanée contrôlée (DIC). Génie des procédés. Université de La Rochelle, 2008. Français. NNT : . tel-00399131

HAL Id: tel-00399131

<https://theses.hal.science/tel-00399131>

Submitted on 25 Jun 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ de la Rochelle
UFR des SCIENCES

Année : 2008

Numéro attribué par la bibliothèque :

--	--	--	--	--	--	--	--

THÈSE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR
de
L'UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE
Discipline: Génie des Procédés Industriels
Présentée et soutenue

Par
Bouthaina BEN AMOR
Le 28 Janvier 2008

TITRE :

**MAITRISE DE L'APTITUDE TECHNOLOGIQUE DE LA MATIERE
VEGETALE DANS LES OPERATIONS D'EXTRACTION DE PRINCIPES
ACTIFS ; TEXTURATION PAR DETENTE INSTANTANEE CONTROLEE
DIC.**

Directeur de thèse : Professeur Karim ALLAF

JURY:

Monsieur	Karim	ALLAF,	Professeur	Université de La Rochelle-France
Madame	Cécile	LAMY	Responsable Cellule Phytochimie - LVMH Recherche	France
Monsieur	Omar	BARKAT	Professeur	Mc Neese University (Louisiane) – USA
Monsieur	Farid	CHEMAT,	Professeur	INRA-Université d'Avignon – France
Monsieur	Eugène	VOROBIEV,	Professeur	UTC de Compiègne – France
Monsieur	Vaclav	SOBOLIK,	Professeur	Université de La Rochelle – France
Invité :				
Monsieur	Patrice	ANDRE,	Directeur de recherche -	LVMH Recherche - France

REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans ce mémoire de thèse a été effectué au sein du Laboratoire Maitrise des Technologies Agro-Industrielles (LMTAI) à La Rochelle, et chez LVMH Recherche à Saint Jean de Braye. J'adresse mes remerciements à leur directeurs, Mr. Karim ALLAF et Mr. Patrice ANDRE de m'avoir accueilli dans leurs établissements respectifs.

Mes chaleureux remerciements vont à Mr Karim ALLAF, directeur de ma thèse, qui a été l'investigateur des travaux sur la Détente Instantanée Contrôlée (DIC).

Je lui suis profondément reconnaissante pour sa confiance, sa patience, son dynamisme, sa sympathie et pour son dévouement. Je le remercie aussi, de m'avoir donné l'opportunité de participer à des congrès nationaux et internationaux. J'exprime également mes vifs remerciements à Mme Cécile LAMY, co-directrice de ma thèse, qui m'a encadré chez LVMH Recherche et grâce à qui j'ai pu notamment acquérir des compétences expérimentales dans le domaine de la chromatographie. Je la remercie profondément de son dévouement, de ses conseils, de son enthousiasme et de son soutien permanent tout au long de ma thèse.

Je souhaite remercier Mr Eugène VOROBIEV et Mr Omar BARKAT qui ont accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail, et M. Vaclav SOBOLIK et Mr Farid CHEMAT qui ont accepté de participer à ce jury en tant qu'examineurs.

Je remercie également Mr Thierry MAUGARD du Laboratoire de Biotechnologie et de Chimie Bio-organique (LBCB) de m'avoir permis d'utiliser l'équipement de spectrométrie de masse. Un grand merci à Nicolas BRIDIAU, thésard au LBCB pour sa disponibilité, son aide précieuse et sa sympathie.

Je tiens également à remercier tous les thésards : Hamid, Ikbal, Sabah, Mazen, Fatima, Tarik, Colette, Nesrin, Baya, les chercheurs invités, les stagiaires, la société ABCAR et plus généralement le personnel scientifique et administratif pour l'ambiance très chaleureuse qu'ils ont assurée au sein du laboratoire LMTAI.

J'adresse aussi mes vifs remerciements à toutes les personnes de l'équipe du Département Innovation Actifs chez LVMH Recherche : Isabelle, Virginie et Nicolas pour leur aide précieuse pour les tests biologiques, Nancy, Virginie, Monique, Jean Christophe et Valérie pour leur sympathie, et leur disponibilité.

Enfin, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à quelques personnes chères qui comptent énormément pour moi. Je pense tout particulièrement à ma grand-mère, mes parents, mes sœurs et mes frères et plus généralement tout mes amis qui m'ont soutenu depuis toujours et que je suis très fier d'avoir à mes côtés.

A la mémoire de ma grand-mère,

SOMMAIRE

PARTIE I .	ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	1
CHAPITRE I-1.	EXTRACTION DE MOLÉCULES ACTIVES	3
I-1.1.	EXTRACTION SOLIDE LIQUIDE	3
I-1.1.a.	Principe.....	3
I-1.1.b.	Mécanisme de l'extraction	4
I-1.1.c.	Facteurs influençant les performances de l'extraction	5
I-1.1.c.i.	Taille des particules.....	5
I-1.1.c.ii.	La nature du solvant.....	5
ii.a.	<i>Pouvoir de solubilisation.....</i>	<i>5</i>
ii.b.	<i>Le pouvoir extractant.....</i>	<i>6</i>
ii.b.1.	La capacité de pénétration.....	7
ii.b.2.	La capacité de diffusion	7
I-1.1.c.iii.	La température	9
I-1.1.c.iv.	Temps d'extraction.....	10
I-1.1.c.v.	Degré d'agitation.....	10
I-1.1.d.	Différentes méthodes d'extraction	10
I-1.1.d.i.	Les méthodes classiques.....	10
I-1.1.d.ii.	Les méthodes alternatives.....	12
ii.a.	<i>Extraction assistée par ultrason</i>	<i>12</i>
ii.b.	<i>Extraction assistée par micro- ondes</i>	<i>14</i>
ii.c.	<i>Extraction par fluide supercritique.....</i>	<i>15</i>
ii.d.	<i>Extraction par solvant accélérée.....</i>	<i>17</i>
CHAPITRE I-2.	OPÉRATIONS DE PRÉTRAITEMENT.....	19
I-2.1.	LE SECHAGE.....	19
I-2.1.a.	L'inhibition.....	19
I-2.1.b.	l'inactivation	19
I-2.2.	LE BROYAGE	20
I-2.2.a.	Généralités	20
I-2.2.b.	Equipements et appareils	20
I-2.2.b.i.	Equipement de laboratoire	20
I-2.2.b.ii.	Les appareils industriels.....	20
I-2.3.	TRAITEMENT ENZYMATIQUE	21
I-2.4.	TRAITEMENT PAR CHAMP ÉLECTRIQUE	21
CHAPITRE I-3.	APPROCHE FONDAMENTALE DES PROCESSUS.....	23
I-3.1.	IDENTIFICATION ET INTENSIFICATION DU PROCESSUS LIMITANT.....	24
I-3.1.a.	Solubilisation des molécules à extraire dans le solvant liquide	24
I-3.1.b.	Transfert du soluté dissous vers l'extérieur.....	24
I-3.1.c.	Les transferts par diffusion.....	25
I-3.1.c.i.	Diffusion du soluté dans le solvant au sein de la matrice solide	25

I-3.1.c.ii.	Diffusion du solvant liquide dans la matrice solide.....	26
I-3.2.	PHENOMENE LIMITANT	27
I-3.3.	COMPLEXITE DU TRANSFERT, APPROCHE NON FICKIENNE ET IMPACT STRUCTUREL	29
I-3.4.	SYNTHESE DE LA MODELISATION	30
I-3.4.a.	Deuxième loi de Fick.....	30
I-3.4.b.	Impact de la température et de la structure dans la modélisation du procédé d'extraction	31
I-3.4.b.i.	Impact de la structure dans la modélisation du procédé d'extraction	31
i.a.	Quantification de l'effet structurel	31
i.b.	L'expansion.....	32
I-3.4.b.ii.	Impact de la température dans la modélisation du procédé d'extraction	32
ii.a.	Caractérisation thermique	33
ii.a.1.	Chaleur massique.....	33
ii.a.2.	Conductivité thermique.....	34
ii.a.3.	Diffusivité thermique	34
I-3.4.c.	Solutions de la deuxième loi de Fick.....	35
I-3.4.c.i.	Solution de Crank.....	35
CHAPITRE I-4. LA STRUCTURE VEGETALE	39	
I-4.1.	LA CELLULE VEGETALE ET SES CONSTITUANTS.....	39
I-4.1.a.	la paroi cellulaire	39
I-4.1.b.	La membrane cellulaire	40
I-4.1.b.i.	Structure de la membrane - Les phospholipides	40
I-4.1.c.	la vacuole.....	41
I-4.1.c.i.	Les glucides.....	41
I-4.1.c.ii.	Les métabolites secondaires.....	41
CHAPITRE I-5. MOLÉCULES ACTIVES	43	
I-5.1.LES ANTHOCYANES DES CALICES D'HIBISCUS SABDARIFFA OU ROSELLE	43	
I-5.1.a.	présentation de la plante.....	43
I-5.1.a.i.	Composition chimique.....	43
i.a.	Les acides organiques.....	44
i.b.	Les pigments : cas des anthocyanes.....	45
i.b.1.	Répartition dans la plante	45
i.b.2.	Biosynthèse des anthocyanes.....	45
i.b.3.	Propriétés des anthocyanes	47
i.b.4.	Procédés technologiques d'extraction des anthocyanes.....	49
i.b.5.	Méthodes d'analyse des pigments et Identification des anthocyanes de la Roselle.....	50
I-5.2.	LES OLIGOSACCHARIDES DES GRAINES DE TEPHROSIA PURPUREA	56

I-5.2.a.	presentation de la plante.....	56
I-5.2.a.i.	Intérêt médicinal de la plante.....	56
I-5.2.a.ii.	Composition chimique.....	56
ii.a.	<i>Les acides gras.....</i>	<i>57</i>
ii.b.	<i>Les acides aminés.....</i>	<i>57</i>
ii.c.	<i>Les roténoïdes.....</i>	<i>58</i>
ii.d.	<i>Les flavonoïdes.....</i>	<i>58</i>
ii.e.	<i>Les stéroïdes.....</i>	<i>58</i>
ii.f.	<i>Les oligosaccharides</i>	<i>59</i>
ii.f.1.	Distribution du stachyose et du cicéritol.....	59
ii.f.2.	Extraction des oligosaccharides	60
ii.f.3.	Analyses et quantification	61
PARTIE II MATÉRIEL ET MÉTHODES.		63
CHAPITRE II-1. TRAITEMENTS		67
II-1.1.	MATIÈRES PREMIÈRES.....	67
II-1.1.a.	graines de <i>Tephrosia purpurea</i>	67
II-1.1.b.	calices de roselle (<i>Hibiscus sabdariffa</i>).....	67
II-1.2.	PRETRAITEMENT	67
II-1.2.a.	réhumidification	67
II-1.2.b.	traitement dic	68
II-1.2.b.i.	Principe.....	68
II-1.2.b.ii.	Protocole de traitement DIC.....	69
II-1.3.	OPERATION D'EXTRACTION	69
II-1.3.a.	extraction des oligosaccharides	69
II-1.3.b.	extraction des anthocyanes.....	71
CHAPITRE II-2. ANALYSES ET QUANTIFICATION		73
II-2.1.	MESURE DE L'HUMIDITE.....	73
II-2.2.	MESURE DE LA MASSE VOLUMIQUE INTRINSEQUE	73
II-2.3.	QUANTIFICATION DES OLIGOSACCHARIDES.....	73
II-2.3.a.	Conditions chromatographiques.....	73
II-2.3.b.	La gamme d'étalonnage	74
II-2.4.	QUANTIFICATION DES ANTHOCYANES	74
II-2.4.a.	Quantification par spectrophotométrie	74
II-2.4.a.i.	Réactifs.....	74
II-2.4.a.ii.	Matériels	74
II-2.4.a.iii.	Gamme d'étalonnage.....	75
II-2.4.b.	Quantification par HPLC	75
II-2.4.b.i.	Conditions chromatographiques.....	75
II-2.4.b.ii.	Gamme d'étalonnage.....	76
II-2.4.c.	identification par spectrometrie de masse	76
II-2.5.	EXPLOITATION DES RESULTATS.....	76
II-2.6.	TESTS BIOLOGIQUES	77

II-2.6.a.	culture cellulaire.....	77
II-2.6.b.	Test de cytotoxicité (XTT).....	78
II-2.6.b.i.	Principe.....	78
II-2.6.b.ii.	Protocole.....	78
II-2.6.c.	dosage des protéines totales : test bca	79
II-2.6.c.i.	Principe.....	79
II-2.6.c.ii.	Protocole.....	79
II-2.6.d.	dosage des AMPc	79
II-2.6.d.i.	Culture.....	79
II-2.6.d.ii.	Protocole.....	80
II-2.7.	<i>MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE</i>	80
CHAPITRE II-3. APPROCHE STATISTIQUE		81
II-3.1.	<i>MÉTHODOLOGIE DES PLANS D'EXPERIENCES.....</i>	81
II-3.2.	<i>ANALYSES STATISTIQUES.....</i>	82
II-3.3.	<i>PLAN D'EXPERIENCES DANS LE TRAITEMENT DIC.....</i>	83
II-3.3.a.	les graines de <i>Tephrosia purpurea</i>	83
II-3.3.b.	les calices de roselle	84
II-3.3.b.i.	Variété de Malaisie	84
II-3.3.b.ii.	Variété d'Egypte.....	84
PARTIE III RESULTATS ET DISCUSSIONS.....		85
CHAPITRE III-1. EFFET DE LA TEXTURATION PAR DIC SUR		
L'EXTRACTION DES OLIGOSACCHARIDES		
DE <i>TEPHROSIA</i> PURPUREA		
89		
III-1.1.	<i>RESUME DE L'ARTICLE</i>	89
III-1.2.	<i>ABSTRACT.....</i>	91
III-1.3.	<i>INTRODUCTION</i>	91
III-1.4.	<i>EXPERIMENTAL PROTOCOL</i>	91
III-1.4.a.	Raw materials.....	91
III-1.4.b.	Chemicals and standards.....	92
III-1.4.c.	Measurement of moisture content.....	92
III-1.4.d.	DIC process	92
III-1.4.d.i.	Experimental set up	92
III-1.4.d.ii.	DIC treatment.....	92
III-1.4.e.	Experimental design	93
III-1.4.f.	Extraction of oligosaccharides.....	94
III-1.4.g.	High performance liquid chromatography	94
III-1.4.g.i.	Sample preparation	94
III-1.4.g.ii.	HPLC-PDA	94
III-1.4.h.	Scanning Electron Microscopy Observation (SEM)	94
III-1.5.	<i>RESULTS AND DISCUSSION.....</i>	94
III-1.5.a.	Kinetics of extraction.....	94

III-1.5.b.	Statistical responses.....	95
III-1.5.b.i.	Yield of extraction	95
III-1.5.b.ii.	Impact of DIC parameters on the yield of extraction	96
ii.a.	Statistical analyses.....	96
ii.b.	Effect of DIC parameters.....	97
III-1.5.c.	Recovery	98
III-1.5.d.	Scanning Electron Microscopy Observation	98
III-1.6.	CONCLUSION.....	100
III-1.7.	REFERENCES.....	101
CHAPITRE III-2. COMPLEMENT D'ESSAIS SUR <i>TEPHROSIA PURPUREA</i> .		103
III-2.1.	<i>EFFET DE LA DIC SUR LA CINETIQUE D'EXTRACTION DES OLIGOSACCHARIDES</i>	104
III-2.1.a.	CICERITOL.....	105
III-2.1.b.	STACHYOSE	105
III-2.2.	<i>ESTIMATION DE LA DIFFUSIVITE EFFECTIVE</i>	106
III-2.3.	<i>ESTIMATION DE LA DIFFUSIVITE APPARENTE</i>	107
III-2.4.	<i>EFFET DE LA DIC SUR LE RENDEMENT D'EXTRACTION DES OLIGOSACCHARIDES</i>	108
CHAPITRE III-3. EFFET DE LA TEMPERATURE SUR L'EXTRACTION D'OLIGOSACCHARIDES.....		111
III-3.1.	<i>RESULTATS EXPERIMENTAUX</i>.....	111
III-3.1.a.	évolution au cours du temps.....	112
III-3.1.b.	énergie d'activation	123
III-3.2.	<i>OPTIMISATION DU PROCEDE D'EXTRACTION</i>.....	129
CHAPITRE III-4. TESTS BIOLOGIQUES		133
III-4.1.	<i>MESURE DE CYTOTOXICITE : TEST XTT</i>	133
III-4.2.	<i>TEST AU BCA</i>.....	135
III-4.3.	<i>DOSAGE DES AMP_C</i>.....	136
CHAPITRE III-5. EFFET DE LA TEXTURATION PAR DIC SUR L'EXTRACTION DES ANTHOCYANES DE LA ROSELLE DE MALAISIE		141
III-5.1.	<i>RESUME DE L'ARTICLE</i>.....	141
III-5.2.	<i>ABSTRACT</i>.....	143
III-5.3.	<i>INTRODUCTION</i>	143
III-5.4.	<i>EXPERIMENTAL PROTOCOL</i>	144
III-5.4.a.	Chemicals and standards.....	144
III-5.4.b.	Measurement of moisture content.....	144
III-5.4.c.	DIC process	144
III-5.4.c.i.	Experimental set up	144
III-5.4.c.ii.	DIC treatment.....	145

III-5.4.d.	Experimental design	145
III-5.4.e.	Extraction of anthocyanins	146
III-5.4.f.	Determination of total anthocyanin content	146
III-5.4.f.i.	Calibration curve	146
III-5.4.f.ii.	Quantification of total monomeric anthocyanins	146
III-5.4.g.	High performance liquid chromatography; Sample preparation	147
III-5.4.g.i.	HPLC-PDA	147
III-5.4.g.ii.	HPLC-MS	147
III-5.4.h.	Determination of anthocyanins diffusivity	147
III-5.5.	RESULTS AND DISCUSSION	147
III-5.5.a.	Kinetics of extraction	147
III-5.5.a.i.	Spectrophotometric investigation	147
III-5.5.a.ii.	HPLC analysis	151
ii.a.	<i>HPLC separation optimization</i>	<i>151</i>
ii.b.	<i>Linearity of the HPLC method</i>	<i>151</i>
ii.c.	<i>Identification of anthocyanins</i>	<i>151</i>
ii.d.	<i>Kinetics of extraction of individual anthocyanins</i>	<i>152</i>
III-5.5.b.	Statistical responses	154
III-5.5.b.i.	Impact of parameters of DIC on the anthocyanins extraction	155
i.a.	<i>Statistical analyses</i>	<i>155</i>
i.b.	<i>Effect of DIC parameters</i>	<i>155</i>
III-5.6.	CONCLUSION	157
III-5.7.	REFERENCES	157
CHAPITRE III-6. EFFET DE LA TEXTURATION PAR DIC SUR L'EXTRACTION DES ANTHOCYANES DE LA ROSELLE D'EGYPTE		
159		
III-6.1.	RESUME DE L'ARTICLE	159
III-6.2.	SUMMARY	161
III-6.3.	INTRODUCTION	161
III-6.4.	EXPERIMENTAL PROTOCOL	162
III-6.4.a.	Raw material and chemicals	162
III-6.4.b.	Measurement of moisture content	162
III-6.4.c.	DIC process	162
III-6.4.c.i.	Experimental set up	162
III-6.4.c.ii.	DIC treatment	163
III-6.4.d.	Experimental design	163
III-6.4.e.	Extraction of anthocyanins	164
III-6.4.f.	Determination of total anthocyanin content	164
III-6.4.f.i.	Calibration curve	164
III-6.4.f.ii.	Quantification of total monomeric anthocyanins	164

III-6.5.	RESULTS AND DISCUSSION.....	165
III-6.5.a.	Yield of extraction	165
III-6.5.b.	Statistical analyses	165
III-6.5.c.	Effect of DIC parameters	166
III-6.6.	CONCLUSION.....	167
III-6.7.	REFERENCES.....	167
PARTIE IV CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES		169
CHAPITRE IV-1. CONCLUSION.....		171
CHAPITRE IV-2. PERSPECTIVES		173
IV-2.1.	SUR LA MATIERE PREMIERE :.....	173
IV-2.2.	SUR LE PLAN FONDAMENTAL.....	173
IV-2.3.	SUR LE PLAN ANALYTIQUE	174
IV-2.4.	INDUSTRIALISATION DU PROCEDE	174
PARTIE V REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		175

NOMENCLATURE

R	Constante des gaz parfaits ($8.314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$).
T	Température exprime en K,
μ_B	Viscosité du solvant B,
γ_A	rayon d'une molécule de soluté A.
μ	la viscosité dynamique (exprimée en Pa.s ou $\text{kg. m}^{-1}.\text{s}^{-1}$),
ρ	la masse volumique (exprimée en kg.m^{-3}),
ν	la viscosité cinématique (exprimée en $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$).
E_a	Energie d'activation, (kJ.mol^{-1})
Bi	nombre de Biot
k	coefficient de transfert (m/s)
l	taille caractéristique de particules (épaisseur/2) (m)
D_s	coefficient de diffusion du soluté (m^2/s)
ρ_e	masse par unité de volume de l'ensemble des molécules solubles dans le solvant (en kg.m^{-3}),
ρ_s	masse par unité de volume du solvant (en kg.m^{-3}).
v_e	vitesse moyenne absolue de l'ensemble des molécules solubles dans le solvant (en m.s^{-1}).
v_s	vitesse moyenne absolue du solvant dans la matrice solide (en m.s^{-1}).
D_{e-s}	Diffusivité de l'extrait au sein du solvant (en $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$).
D_{jS}	Coefficient de diffusion du constituant j dans le solvant S. (en $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$)
M_s	Masse molaire du solvant (g.mol^{-1}).
μ	viscosité du solvant (en kg/m.s)
v_j	volume molaire du constituant j (m^3/mol)
ρ_m	masse par unité de volume de la matrice solide du milieu poreux (kg.m^{-3}).
V_s	vitesse moyenne absolue du solvant dans la matrice solide du milieu poreux (m.s^{-1}).
v_m	vitesse moyenne absolue de la matrice solide (en m.s^{-1}).
D_{s-m}	Diffusivité du solvant dans la matrice solide du milieu poreux (en $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$).
X	la teneur en extrait du solide. (mg/g MS)
X_m	quantité d'extrait dans le solide à l'équilibre (mg/g MS)
X_0	quantité initiale d'extrait, contenue dans le solide (mg/g MS)
A_i et q_i	coefficients qui dépendent de la géométrie du solide.
D_{eff}	diffusivité effective (m^2/s)

Y_{∞}	teneur en soluté dans l'extrait (mg/g MS)
Y_0	teneur en soluté dans l'extrait à $t=0$ correspondant à l'extraction de la quantité de soluté se trouvant à la surface du solide (m_0) (mg/g MS)
Y	teneur en soluté dans l'extrait à t (mg/g MS)

INTRODUCTION

Les plantes produisent une grande diversité de métabolites secondaires pour la défense et la survie dans l'écosystème. Les métabolites secondaires végétaux, dépassant actuellement 100 000 substances identifiées, appartiennent à trois classes principales de chimiques : les terpènes (un groupe de lipides), les phénoliques (dérivés de glucides) et les alcaloïdes (dérivés d'acides aminées).

Les métabolites secondaires sont recherchés parce qu'ils sont reconnus pour leurs activités biologiques nombreuses qui promeuvent des effets positifs de santé. Ces activités comprennent des activités antibactériennes, anticancéreuses, antifongiques et antioxydantes utilisées dans les secteurs industriels de l'agriculture, de l'alimentation et des pharmaceutiques. Du fait de ces nombreuses utilisations, le marché global des extraits végétaux et des métabolites secondaires isolés est en pleine croissance. La valeur pharmacologique des métabolites secondaires végétaux augmente en raison de la tendance vers les produits naturels et des découvertes continues sur leurs rôles potentiels en soins de santé et comme précurseurs chimiques pour le développement de nouveaux médicaments.

Les métabolites secondaires, généralement de 1 à 3% de la masse de la matière végétale déshydratée, sont synthétisés dans des cellules spécialisées à des stades de développement distincts et ont des structures très complexes, ce qui rend leur extraction et purification difficile.

L'extraction par un solvant reste le procédé le plus largement employé. Cependant le transfert de matière qui s'effectue lors de l'extraction par un solvant est entravé et limité par la structure et la paroi cellulaire des végétaux. Pour contourner cette difficulté, plusieurs solutions ont été proposées : soit des prétraitements tels que la réduction de la taille des particules par broyage, les traitements enzymatiques... ou des améliorations dans le procédé classique d'extraction par solvant telles que l'utilisation des ultrasons, des micro-ondes, des solvants accélérés, l'extraction par fluide supercritique etc. Ces différentes solutions n'ont pas répondu de façon définitive à la problématique.

Pour remédier à cette problématique, on propose dans ce travail d'étudier l'intérêt de la modification de la microstructure de la matière, par l'application d'un traitement de Détente Instantanée Contrôlée (DIC), capable éventuellement d'améliorer ses aptitudes technologiques vis-à-vis de l'extraction solide-liquide. Nous visons l'étude de l'effet des paramètres opératoires de la DIC sur l'extraction d'oligosaccharides (cicéritol et stachyose) à partir de graines de *Tephrosia purpurea* ainsi que sur l'extraction d'anthocyanes à partir de la Roselle (*Hibiscus sabdariffa*).

La compréhension et la maîtrise du processus passent par une analyse fondamentale des phénomènes ayant lieu ; l'approche théorique des processus et la capacité de modélisation sont des outils indispensables à la bonne maîtrise des procédés.

Ce rapport est composé des parties suivantes :

Le premier chapitre de la première partie présente l'état de l'art à travers une synthèse bibliographique dans laquelle sont traités l'opération d'extraction, ses différents modes et paramètres et les différents prétraitements qui la précèdent. Par la suite, le second chapitre de cette même partie est consacré à l'approche fondamentale du processus, la définition des différentes étapes et l'identification du processus limitant. Finalement, la

structure et l'organisation du matériel végétal ainsi qu'une présentation du matériel utilisé ont été développées.

Une deuxième partie expose les démarches expérimentales ; elle comporte les moyens technologiques de traitement et les méthodes et protocoles d'analyse que nous avons été amenés à adopter pour mener à bien l'ensemble de cette étude.

Une troisième partie est consacrée aux résultats expérimentaux ; elle regroupe dans un premier chapitre les résultats de l'effet des paramètres opératoires de la DIC sur l'extraction des oligosaccharides à partir des graines de *Tephrosia purpurea* (un article). Cette partie du travail a pour objectif de dresser les conditions de traitement par DIC pour les optimiser en vue d'aboutir à la meilleure extraction de ces différents métabolites. L'étude portait sur une comparaison du comportement vis-à-vis de l'extraction de la matière première et celle traitée par DIC selon différentes conditions opératoires d'un plan d'expériences, en termes de cinétique et de quantité maximale extraite.

Un deuxième chapitre concerne l'étude de la cinétique, l'effet de la température sur l'opération d'extraction des oligosaccharides à partir de *Tephrosia purpurea*, et l'optimisation de l'opération d'extraction à la suite du traitement par DIC. En effet, une fois les conditions de traitement par DIC optimisées, nous avons cherché à quantifier les principaux paramètres opératoires de l'extraction par solvant proprement dite (température, concentration en solvant) en vue d'aboutir aux meilleurs résultats technico-économiques.

Dans un troisième chapitre, nous présentons une étude comparative, que nous avons réalisée à travers des tests biologiques de l'activité de l'extrait à partir de la matière première non traitée et de la matière ayant subi les conditions optimisées du traitement par DIC.

Un quatrième chapitre regroupe, sous forme de deux publications, les résultats de l'effet des paramètres opératoires de la DIC sur l'extraction des anthocyanes à partir de la Roselle (*Hibiscus sabdariffa*)

La dernière partie, se présente sous forme d'une conclusion générale sur les différents travaux réalisés et les perspectives des actions à mener.

PARTIE I.

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I-1.

EXTRACTION DE MOLÉCULES ACTIVES

I-1.1. EXTRACTION SOLIDE LIQUIDE

I-1.1.a. PRINCIPE

Dans les processus d'extraction et de séparation de molécules spécifiques (molécules actives) présentes dans un milieu solide, l'opération fait souvent appel, d'un point de vue technologique, à la diffusion au sein du solide d'un fluide (liquide) porteur, dit solvant d'extraction ; l'extraction se présente ainsi comme une interaction solide – liquide.

Cependant, le solvant, capable de « mettre en solution » un ou plusieurs composants solides, cristallisés ou liquides, dénommé soluté (Mafart and Béliard 1993), génère une solution ou un extrait (solvant+soluté). Le transfert de ces molécules actives recherchées, vers le milieu extérieur a lieu grâce à une diffusion ayant pour élément moteur le gradient de concentration en soluté entre la solution au voisinage intime de la phase solide (plus concentrée) et la phase liquide. A la fin de l'opération, le système tend vers l'équilibre et la diffusion est quasi nulle. Par contre si la phase liquide est continuellement renouvelée, la diffusion se poursuit jusqu'à épuisement de la phase solide (Dibert 1989).

A la fin de l'opération, le solide épuisé, appelé résidu, inerte ou insoluble, contient très peu ou pas de soluté. En règle générale, c'est la solution qui constitue la phase noble, mais il se peut que ça soit le résidu solide insoluble qui présente la vraie valeur économique (Bimbenet, Duquenoy et al. 1993).

L'extraction est une opération ancienne utilisée pour retirer des plantes et de certains organes d'animaux, des produits alimentaires, pharmaceutiques ou odoriférants, sous formes de breuvages, drogues ou parfums. Les solvants utilisés dans ces procédés de séparation des produits végétaux sont généralement l'eau, les alcools, les solvants organiques et/ou chlorés, etc.

Les opérations d'extraction solide-liquide regroupent plusieurs méthodes différentes consistant toutes à faire interagir le solvant sur le matériau solide afin de dissoudre ses composants solubles :

La percolation : consiste à laisser couler un solvant (généralement très chaud) sur un lit de solides finement divisés. La préparation du café relève de cette opération. (Leybros and Frémeaux 1990).

La décoction : est l'opération dans laquelle le solide est plongé dans le solvant liquide mis en ébullition. Il s'agit d'une opération brutale qui doit être réservée à l'extraction de principes actifs non thermolabiles. Elle est cependant très rapide et parfois indispensable (Leybros and Frémeaux 1990).

L'infusion : est une décoction durant laquelle le solvant est chauffé sans être mis en ébullition, suivie du refroidissement du mélange. La préparation du thé est l'exemple type de cette opération (Groubert 1984; Leybros and Frémeaux 1990).

La macération : est une infusion dans un solvant à froid. L'opération bien que généralement longue et à rendement souvent médiocre, est la seule méthode utilisable dans le cas de l'extraction d'un ensemble de molécules fragiles. Pour être efficace, une macération, peut durer de 4 à 10 jours environ ; ceci peut présenter quelques inconvénients, en termes de fermentation, ou de contamination bactérienne notamment

si le solvant utilisé est l'eau. Ces phénomènes peuvent entraîner une dégradation rapide des molécules actives. En vue d'éviter ou de réduire ces inconvénients, la macération peut être opérée dans un récipient couvert, le tout à l'abri de la lumière et, dans certains cas, maintenue dans un réfrigérateur (Groubert 1984; Leybros and Frémeaux 1990).

La digestion : est une macération à chaud. Cette opération et la macération sont utilisées particulièrement en pharmacie et en parfumerie. Il s'agit là d'une opération plus rapide que la précédente, ne posant généralement aucun problème de conservation ni de contamination bactérienne (Groubert 1984; Leybros and Frémeaux 1990).

L'éluion : consiste à enlever un soluté fixé à la surface d'un solide par simple contact avec un solvant. Elle est fréquemment utilisée dans les méthodes d'analyse (Leybros and Frémeaux 1990).

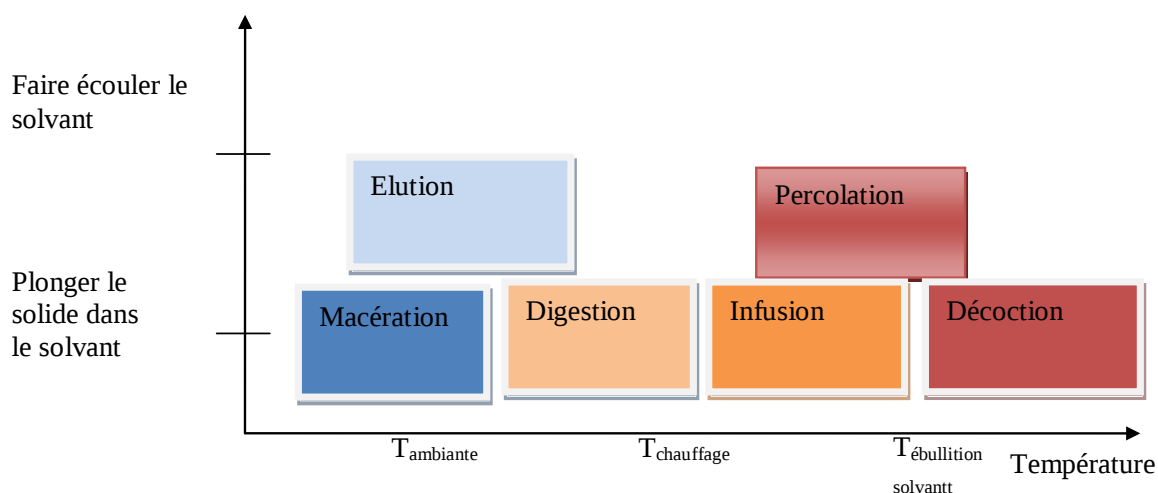


Figure I-1 : Schéma des différents modes d'extraction en fonction de la température et du contact avec le solvant.

I-1.1.b. MECANISME DE L'EXTRACTION

L'extraction solide/liquide est réalisée par contact intime entre le solide et le solvant. Au cours de l'extraction, la concentration du soluté dans le solide varie sans interruption, ce qui explique un état non stationnaire de transfert de matière. Une série de processus successifs a lieu traduisant l'interaction entre le solide contenant initialement le soluté, et le solvant effectuant la séparation ; ces processus concernent :

1. la diffusion du solvant au sein de la matrice solide,
2. la dissolution du soluté dans le solvant,
3. la diffusion du soluté dissous dans le solvant de la matrice solide vers la surface,
4. le transfert par convection ou diffusion du soluté contenu dans la solution près du solide vers la masse restante du solvant.

L'extraction, souvent étudiée au plan phénoménologique comme une opération unifiée, peut être analysée en termes de cinétique et de rendement total. La cinétique est généralement exprimée en termes de concentration du soluté dans le solide par unité de temps (dx/dt). La nature séquentielle de ces quatre processus fait que l'opération globale d'extraction se déroule à la vitesse du processus le plus lent, qualifiée alors du processus limitant du procédé.

Dans le cas de la plupart des végétaux, c'est l'étape du transfert du solvant à travers la matrice solide qui constitue l'étape limitante. En effet, la microstructure naturelle des végétaux génère une mauvaise aptitude quant à la diffusion interne des liquides. Une

relation étroite existe alors entre la vitesse d'extraction et la structure de la matière. Pour mieux analyser cet aspect, il faudrait commencer par aborder les notions théoriques du transfert de masse.

I-1.1.c. FACTEURS INFLUENÇANT LES PERFORMANCES DE L'EXTRACTION

I-1.1.c.i. Taille des particules

Tous les auteurs s'accordent sur l'effet généralement positif du broyage sur les opérations d'extraction. Le broyage du solide permet d'intensifier les phénomènes de transfert du solvant à travers l'augmentation de la surface spécifique (surface d'échange entre le solvant et le solide) mais également la réduction de la distance de pénétration dans le matériel. En effet, à taux de solide donné, la surface de contact entre le solide et le liquide augmente lorsque la taille de la particule diminue à travers l'augmentation de la surface spécifique comme $6/d_p$ (Mohammad Mounir 2007). D'autre part, dans les opérations de transfert de matière par diffusion (Fick ; etc.), le gradient de concentration augmente directement avec la diminution de la taille de la particule et le temps de traversée nécessaire intervient généralement proportionnellement au carré de la distance traversée. L'opération doit donc être nettement mieux intensifiée à la suite d'un bon broyage (Mafart and Béliard 1993).

Nous pouvons ainsi citer à titre d'exemples que de plus grands rendements d'extraction de composés phénoliques et d'anthocyanes ont été observés avec la diminution de la taille des particules de tournesol (Gao et Mazza, 1996) ; (Pifferi and Vaccari 1983) ou des résidus de pression de jus de cassis (Landbo and Meyer 2001).

On est cependant limité dans la finesse des particules : la présence de fines induit une exagération dans ce sens et implique une réduction notable de la perméabilité du lit de solides au solvant, ce qui entraîne l'établissement de courants préférentiels bloquant ainsi le processus d'extraction dans certains endroits où le solvant ne peut plus circuler (Dibert 1989; Leybros and Frémeaux 1990).

I-1.1.c.ii. La nature du solvant

Un solvant est, par définition, une substance qui a le pouvoir de former avec d'autres substances une solution homogène (Gerin 2002). Un solvant d'extraction est choisi en fonction de :

- ✚ Ses propriétés physiques : densité, viscosité, point d'ébullition, chaleur spécifique, etc. déterminant les conditions de l'épuisement, vitesse d'écoulement et de filtration, conditions de distillation et de concentration, pertes par volatilisation, ... (Vigneron 1954),
- ✚ La nature des principes à dissoudre,
- ✚ Ses caractéristiques économiques et son prix de revient.

Le solvant doit être sélectif, posséder une grande capacité de dissolution, une température d'ébullition peu élevée, une faible viscosité et être, si possible, non toxique, ininflammable, et non explosif.

ii.a. Pouvoir de solubilisation

Le pouvoir de solubilisation d'un solvant est rattaché à ses caractéristiques moléculaires, définissant notamment sa polarité et son hydrophilie, utilisées en tant qu'indicateurs de l'affinité chimique. Les caractéristiques de polarité et d'hydrophilie sont notamment révélées par :

- ✚ La présence de groupes fonctionnels dissociant,
- ✚ Le potentiel de liaison hydrogène et la faculté de mise en commun d'électrons,

Cette approche sur la capacité extractive des solvants se justifie d'autant plus qu'elle concerne des substrats végétaux dont la teneur en eau peut atteindre 80% pour les matières fraîches. L'affinité eau/solvant conditionne la diffusion dans les tissus riches en eau interstitielle et dans les cellules où l'eau libre est abondante.

En outre, la solubilisation peut atteindre le milieu interstitiel qui participe à l'intégrité des tissus. Cette action prime sur les facteurs intervenant sur le pouvoir extractant, notamment à travers la diffusion en relation avec les propriétés physiques du solvant. Par sa qualité destructurante, elle a pour incidence d'assurer la diffusion du solvant dans les tissus végétaux (Cu, Perineau et al. 1989). Indicateur de l'affinité vis-à-vis de l'eau, une forte polarité se traduit soit par une action directe du solvant sur les constituants polaires du contenu cellulaire, soit par une solubilisation de certains de ces constituants ou encore par une rupture des interactions.

Un exemple de cette interaction et cette rupture concerne l'éthanol, qui a une grande affinité pour l'eau. Il déstabilise les interactions hydrophobes responsables de la structure tertiaire des molécules protéiques ou lipoprotéiques présentes dans les membranes cellulaires. De plus, l'action alcoolisée de l'éthanol, provoque certaines dégradations au sein des matières végétales portant notamment sur la rupture des ponts éther des molécules phénoliques, en particulier des motifs de lignine (Brauns 1952; Schultz and Ambroscheit 1989). L'éthanol modifie donc la structure des tissus ligneux ainsi que le contenu cellulaire des matières traitées.

Quelles que soient ses propriétés physiques déterminant sa diffusion, l'éthanol bénéficie d'un fort pouvoir extractant dès lors que la majorité des tissus, dont les tissus structuraux et de soutien de la matière végétale, est d'origine lignocellulosique. En ce qui concerne l'affinité vis-à-vis de l'eau, deux facteurs sont à prendre en compte : la solubilité du solvant dans l'eau et la solubilité de l'eau dans le solvant. Ces facteurs interviendront vraisemblablement sur la diffusion des produits à l'intérieur du contenu cellulaire, notamment la solubilité dans l'eau pour la circulation du solvant dans les milieux hydratés. La solubilité de l'eau et sa polarité seront plus particulièrement déterminantes pour prévoir le pouvoir du solvant vis-à-vis des composés hydrophiles dans un milieu hydrophile.

Cependant, on ne peut établir la capacité extractive d'un solvant vis-à-vis d'un soluté donné en se basant sur la seule solubilité (ou l'insolubilité) des corps purs dans le solvant. La solubilité d'un corps peut être complètement modifiée par la présence des diverses substances dans la plante : une substance insoluble dans l'eau à l'état pur pourra se trouver en abondance dans un soluté aqueux végétal. Les principes existent en effet le plus souvent sous forme de complexes et ceci est particulièrement vrai pour la plante fraîche. C'est ainsi que les alcaloïdes se présentent sous forme de sels minéraux ou organiques, que les anthocyanosides peuvent être acétylées, que les acides-phénols complexes sont majoritaires, qu'il est souvent fait mention de complexes-tannoïdes, que les glucosides se trouvent à l'état colloïdal dans le cytoplasme, que la chlorophylle contracte des liaisons avec les caroténoïdes-protéines-phospholipides (Ollier 1991).

ii.b. Le pouvoir extractant

L'estimation de l'efficacité d'un solvant ne peut être réduite aux seules propriétés chimiques de polarité et d'affinité vis à vis de l'eau. Nous devons également tenir compte des propriétés physiques déterminant la capacité du solvant à pénétrer dans une matrice

poreuse ; nous parlons alors du pouvoir extractant qui est défini par la capacité du solvant à pénétrer et à diffuser dans la structure végétale de telle sorte qu'il rencontre et entraîne les molécules cibles. Evidemment ce dernier processus suggère la solubilisation de ces molécules par le solvant. Il est clair que ces notions de pouvoir solvant et extractant, ainsi que de sélectivité chimique, sont liées les unes aux autres par les caractéristiques chimiques et physiques du solvant. Nous tenterons d'apprécier le pouvoir extractant selon deux composants eux-mêmes liés à plusieurs paramètres indiqués ci-dessous :

✚ La **capacité de pénétration** : tension superficielle et viscosité,

✚ La **capacité de diffusion**.

ii.b.1. La capacité de pénétration

Plus la tension superficielle d'un liquide dans lequel on immerge un solide poreux tel qu'un substrat végétal est faible, mieux est assuré le mouillage des pores, et ce, d'autant plus que ces pores sont de petite dimension ; c'est ainsi qu'est assurée une efficacité dans la pénétration du liquide, notamment dans le cas d'une matière à organisation cellulaire.

Plus la viscosité est faible, mieux le liquide s'écoule dans les pores et mieux il circule dans les espaces intercellulaires (Cu, Perineau et al. 1989) .

ii.b.2. La capacité de diffusion

Le choix d'un solvant à faible viscosité et à masse volumique peu élevée est recommandé pour accélérer sa diffusion, faciliter son agitation et améliorer la séparation mécanique. (Dibert 1989; Leybros and Frémeaux 1990).

La diffusion d'un composé A dans un système binaire A-B a généralement lieu grâce au gradient de concentration de A. Ce phénomène est appelé « diffusion ordinaire », par opposition à la diffusion sous pression où le mouvement de A est dû à un gradient de pression, ou la diffusion thermique (la progression de A découle d'un gradient thermique), ou la diffusion forcée (la dispersion de A résulte d'un apport énergétique externe quelconque). La diffusion dans un système multiphasique est plus complexe car elle n'est pas régie par un simple équilibre de la viscosité au sein du milieu (Bird, Steward et al. 1976). (Liley, Reide et al. 1984) utilisent l'équation de STOKES EINSTEIN pour calculer le **coefficient de diffusion** de A dans B en phase liquide.

Équation I-1/

$$D_{AB} = \frac{RT}{6\pi\mu_B\gamma_A}$$

Où :

R = Constante des gaz parfaits (8.314 J.mol⁻¹.K⁻¹).

T = Température exprime en K,

μ_B = Viscosité du solvant B,

γ_A = rayon d'une molécule de soluté A.

Le coefficient de diffusion des solvants dans les matières végétales (solides) est impossible à déterminer selon ce modèle mathématique, car les matières végétales sont des corps complexes hétérogènes pour lesquels on ne dispose pas des constantes physico-chimiques. Cependant, (Liley, Reide et al. 1984) montrent que le coefficient de diffusion des solvants est lié à leur viscosité. En ce qui concerne la diffusivité d'une solvant dans une matière végétale, (Krasuk, Lombardi et al. 1967) rapportent qu'elle

dépend de certains facteurs internes tels que l'épaisseur et la taille des particules, les teneurs en eau et en huile, etc.

Ainsi la diffusivité est fréquemment corrélée à la viscosité cinématique (ν) définie par :

Équation I-2/
$$\nu = \frac{\mu}{\rho} \quad (\text{Krasuk, Lombardi et al. 1967})$$

Où.

μ est la viscosité dynamique (exprimée en Pa.s ou kg. m⁻¹.s⁻¹),

ρ est la masse volumique (exprimée en kg.m⁻³),

ν est la viscosité cinématique (exprimée en m².s⁻¹).

(Spiro, Kandiah et al. 1990) ont étudié la vitesse de diffusion de différents solvants dans une partie de gingembre. Ils ont effectivement corrélé la vitesse de diffusion des solvants à leur viscosité cinématique (relation universelle proportionnelle). Par contre, selon leurs résultats, elle est indépendante de l'énergie de cohésion moléculaire (que les auteurs rapprochent du point d'ébullition), et du volume moléculaire bien que celui-ci soit théoriquement un indicateur du pouvoir de pénétration du solvant dans une structure poreuse.

Pour de nombreuses raisons évidentes, l'eau est le solvant le plus utilisé en Industrie Agroalimentaire. Elle est le solvant le plus universel puisqu'elle convient à l'extraction des sucres, de matières azotées et à celle des sels minéraux (Bimbenet, Duquenoy et al. 1993).

Les autres principaux solvants utilisés sont les alcools (méthanol, éthanol), les hydrocarbures (hexane) et les solvants halogénés. Les solvants chlorés qui sont moins sélectifs que les hydrocarbures, ont des diffusivités plus élevées (Vigneron 1954).

Le Tableau I-1, résume les caractéristiques de quelques solvants parmi les plus usuels.

Tableau I-1 : propriétés physiques des solvants les plus usuels (Vigneron 1954) .

	Masse volumique (kg/m ³)	solubilité à 15°C dans 100 cm ³ d'eau	Polarité (moment dipolaire *10 ¹⁸)	Tension superficielle mN/m	Point d'ébullition (°C)	Chaleur spécifique (kcal/kg/°C)
non ou peu polaires, utilisés pour l'extraction de molécules non ou peu polaires (huiles, essences, stéroïdes)						
Heptane	679	0.005	0		98	0.507
Trichloréthylène	1 455	0.01			152	0.223
Hexane	655	0.014	0	18.4	69	0.527
Toluène	862	0.047	0	28.4	110	0.364
Benzène	873	0.073				
Tetrachlorure de carbone	1 580	0.08	0	26.8	76.7	0.198
Sulfure de carbone	1 260	0.218	0	33	46.2	
Doués d'une faible polarité						
Chloroforme	1 479	0.621	1.05	27.3	61	0.232
Ether	707	7.42	1.14	17	34	0.521
Acétate d'éthyle	894	8.4	1.86	24.3	77	0.457
Doués d'une forte polarité, pouvant être modifiée par mélanges						
Méthylal	853				42.3	0.521
Acétone	788		2.8	23.7	56	0.514

Alcool méthylique	796		1.68	22.6	64.5	0.59
Alcool éthylique	785		1.7	22.2	78	0.505
Eau	1000	-	1,8	71	100	1

Les solvants organiques de polarité faible ou nulle dissolvent les principes dont la structure comporte surtout des chaînes ou groupements hydrophobes : lipides, stérols, terpènes, huiles essentielles.

Certains sont ininflammables (chloroforme, tétrachlorure de carbone, trichlorométhylène). La plupart sont inflammables : éther, benzène, carbures d'hydrogène et produits de rectification du pétrole : éther de pétrole, hexane, heptane, ligroïne, kérosène.

Les solvants polaires tels que l'acétone, l'eau dissolvent les principes riches en groupements hydrophiles : sucres, acides et alcools de faible poids moléculaire, nitrites etc. Certains solvants par mélange avec des proportions variables d'eau agissent comme des agents tantôt hydrophobes (éthanol absolu, éthanol à 95°) tantôt hydrophiles (éthanol à bas degré) (Vignerot 1954).

I-1.1.c.iii. La température

Il est difficile de cerner de façon simple l'influence de la température sur l'extraction. Dans la plupart des cas, les gammes élevées de température sont favorables au rendement d'extraction et ceci pour quatre principales raisons :

- ✚ La chaleur facilite l'extraction en perméabilisant les parois cellulaires par dénaturation,
- ✚ La gamme des hautes températures usuelles, augmente la solubilité des matières à extraire,
- ✚ Elle augmente les coefficients de diffusion,
- ✚ enfin, elle diminue la viscosité des solvants d'extraction, ce qui facilite non seulement le passage du solvant à travers la masse de substrat solide, mais aussi les opérations ultérieures de séparation.

La limite supérieure de la température est imposée par le point d'ébullition du solvant, par les risques de :

- ✚ dégradation thermique du soluté
- ✚ risques d'extraire des composés nuisibles (Leybros and Frémeaux 1990; Binbenet, Duquenoy et al. 1993).

Plusieurs travaux ont conclu de l'effet positif de l'augmentation de la température sur la cinétique d'extraction et la diffusivité des composés phénoliques à partir de la fraise (Cacace and Mazza 2003), des anthocyanes à partir de la carotte noire (Turker and Erdogdu 2005) et de composés solubles dans l'eau à partir des oranges (Chambers, Exaudi-Larsen et al. 1996). Ils ont montré que la diffusion de ces différents composés dépend énormément de la température et que l'influence de cette dernière est généralement caractérisée par la variation du coefficient de diffusion consécutivement à la variation de la viscosité du milieu, comme établie par l'équation d'Einstein :

Équation I-3/
$$D \propto (T/\mu).$$

Où T est la température absolue et μ la viscosité dynamique (Loncin and Merson 1979). Cependant, la stabilité des anthocyanes, composés phénoliques principaux des baies

rouges et pourpres, est affectée par la température (Mazza and Miniati 1993). La dénaturation des membranes peut se produire à 55-75°C (Schwartzberg and Chao 1982) et affecter le processus d'extraction ; par conséquent la température ne peut pas être augmentée indéfiniment et un compromis doit alors être déterminée pour optimiser l'extraction.

Or, la viscosité diminue généralement avec la température ce qui permet une nette augmentation de la diffusivité vis-à-vis de la température. De nombreux auteurs ont montré que le coefficient de diffusion D_s , est relié à la température absolue T , suivant une relation comparable à la loi d'Arrhenius décrite par :

Équation I-4/
$$D_s = D_{s0} e^{-\frac{E_a}{RT}}$$

Avec T (K) la température absolue, D_{s0} ($m^2.s^{-1}$) une constante, E_a ($kJ.mol^{-1}$) l'énergie d'activation, R la constante universelle ($8,314 J.mol^{-1}.K^{-1}$).

I-1.1.c.iv. Temps d'extraction

Les quantités de substances extraites sont fonction du temps de séjour du matériel au sein du solvant (temps nécessaire à la pénétration du solvant à l'intérieur des vacuoles, dissolution du composé etc.)

Généralement, une élévation de la température traduisant l'agitation moléculaire permet de diminuer les temps de contact et ce, sans diminution notable du rendement.

A titre indicatif, une méthode comme la macération dure environ 8 à 10 jours, par contre des méthodes comme la décoction ne nécessitent que des temps de contact rapides de l'ordre d'une dizaine de minutes (Groubert 1984).

I-1.1.c.v. Degré d'agitation

L'agitation mécanique des particules dans le solvant, qui permet leur maintien en suspension et l'homogénéisation du milieu, a un effet toujours favorable sur l'opération. Dans le cas de l'extraction aqueuse, l'agitation permet de réduire la résistance au transfert de solutés au niveau de l'interface solide liquide (couche limite) et d'augmenter le coefficient de transfert.

Si l'agitation est maintenue durant une longue période, elle va favoriser les chocs entre les différentes particules et permettre ainsi l'éclatement de certaines cellules qui vont libérer leur contenu cellulaire dans le milieu (Dibert 1989; Leybros and Frémeaux 1990).

I-1.1.d. DIFFÉRENTES MÉTHODES D'EXTRACTION

I-1.1.d.i. Les méthodes classiques

Les techniques classiques pour l'extraction par solvants de molécules actives à partir des matrices végétales sont basées sur le choix du solvant couplé à la température et/ou à l'agitation. Les techniques classiques existantes permettant d'extraire ces principes actifs incluent : Soxhlet, l'hydro-distillation et la macération avec un mélange alcool-eau ou une graisse chaude. L'extraction par Soxhlet, qui a été employé pendant longtemps, est une technique standard et la référence principale pour évaluer la performance d'autres méthodes d'extraction solide-liquide. L'extraction par Soxhlet est une technique générale et bien établie, et qui dépasse en performance les autres techniques conventionnelles d'extraction, excepté dans le cas de l'extraction des composés thermolabiles (Luque de Castro and Garcia-Ayuso 1998).

Dans un système conventionnel de Soxhlet comme montré dans la figure 2, la matière végétale est placée dans une cartouche, et remplie de solvant frais condensé à partir d'un ballon à distiller. Quand le liquide atteint le niveau de débordement, un siphon aspire la solution de la cartouche et la décharge de nouveau dans le ballon à distiller, portant les corps dissous extraits dans le liquide en bloc. Dans le ballon, le corps dissous (soluté) est séparé du solvant par distillation. Le soluté reste dans le flacon et le solvant frais passe de nouveau dans le lit de solide. L'opération est répétée jusqu'à ce que l'extraction complète soit réalisée.

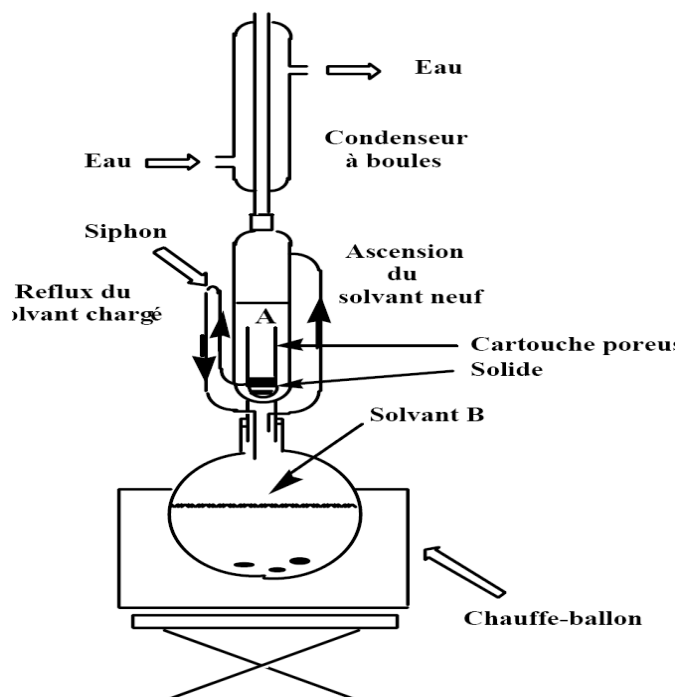


Figure I-2 : dispositif expérimental d'un extracteur Soxhlet

L'extraction par Soxhlet dépend fortement des caractéristiques de la matrice solide et de la dimension des particules vu que la diffusion interne est souvent l'étape limitante pendant l'extraction. Pour l'extraction de l'huile totale des graines oléagineuses, une extraction pendant 2h a donné une efficacité de rendement d'extraction de 99% si la dimension particulaire était de 0.4 millimètre, alors que 12h extraction étaient nécessaires pour obtenir la même efficacité si la dimension particulaire était de 2.0 millimètres (Luque-Garcia and Luque de Castro 2004).

Les avantages de l'extraction par Soxhlet incluent :

- ✚ Le déplacement de l'équilibre de transfert en mettant à plusieurs reprises le solvant frais en contact avec la matrice solide,
- ✚ Le maintien d'une température relativement élevée d'extraction avec la chaleur du ballon à distiller,
- ✚ Aucune nécessité de filtration après l'extraction. En outre, la méthode de Soxhlet est très simple et bon marché.

Cependant, cette méthode présente des inconvénients :

- ✚ Le temps d'extraction est long,
- ✚ Une grande quantité de solvant est nécessaire,
- ✚ Il est impossible d'accélérer le processus par agitation,

- ✚ La grande quantité de solvant utilisée exige une étape d'évaporation / concentration
- ✚ La possibilité de dégradation thermique des composés cible ne peut pas être ignorée vu que l'extraction s'opère habituellement au point d'ébullition du solvant pendant un temps assez long.

La grande quantité de solvant ainsi que la longue durée de l'opération ont conduit à de larges critiques de cette méthode.

I-1.1.d.ii. Les méthodes alternatives

L'extraction de Soxhlet est une technique généralement bien établie. Les diverses applications, la bonne reproductibilité, l'efficacité et l'aisance avec laquelle les extraits sont manipulés sont les avantages spécifiques de l'extraction par Soxhlet ; la simplicité de l'équipement permet à cette méthode de se maintenir par rapport à de nouvelles techniques telles que les extractions par ultrasons, assistée par micro-ondes, par fluide super critique ou par solvants accélérées, malgré une meilleure vitesse d'extraction de ces dernières. Le soxhlet souffre également de sa consommation d'une quantité importante de solvant dont quelques uns ont récemment été remis en cause en raison de leur toxicité.

Quelques améliorations pourront cependant être envisagées et apportées au système d'extraction par Soxhlet (dispositifs auxiliaires de pompe à vide, unité de séparation par membrane, source d'ultrasons et de micro-ondes, fluides supercritiques) ; elles pourraient en améliorer l'efficacité tout en préservant ses principaux avantages actuels.

ii.a. Extraction assistée par ultrason

Au-delà de 20 kHz, les ondes sonores génèrent des vibrations mécaniques dans un solide, un liquide ou un gaz. À la différence des ondes électromagnétiques, les ondes sonores peuvent propager dans une matière et elles impliquent des cycles d'expansion et de compression lors de la propagation dans le milieu. L'expansion peut créer des bulles qui se forment, se développent et s'effondrent dans un liquide. Près d'une surface solide, l'effondrement de cavité est asymétrique et produit un jet de liquide à grande vitesse. Le jet liquide a un fort impact sur la surface solide (Luque-Garcia and Luque de Castro 2003).

Il existe deux conceptions générales des extracteurs assistés par ultrason: les bains ultrasoniques ou les extracteurs fermés équipés d'un capteur ultrasonique. Les effets mécaniques des ultrasons induisent une plus grande pénétration du solvant dans les matériaux cellulaires et améliorent le transfert de masse. Les ultrasons dans l'extraction peuvent également perturber les parois cellulaires, facilitant la libération de leur contenu. Par conséquent, l'efficacité de rupture des cellules et du transfert de masse sont cités en tant que deux facteurs principaux menant aux bonnes performances de l'extraction avec la puissance ultrasonique (Mason, Paniwnyk et al. 1996).

Les micrographes électroniques à balayage (MEB) ont fourni l'évidence des effets mécaniques des ultrasons, principalement montrés par la destruction des parois cellulaires et la libération du contenu cellulaires. Contrairement aux extractions conventionnelles, les extraits de plantes diffusent à travers des parois cellulaires fragilisées par les ultrasons du fait d'une rupture rapide des parois cellulaires (Chemat, Lagha et al. 2004; Li, Pordesimo et al. 2004).

Il est nécessaire de tenir compte des caractéristiques de la matière végétale telles que le taux d'humidité, la dimension des particules et du solvant employé afin d'obtenir une

extraction efficace par ultrason. En outre, beaucoup de facteurs régissent l'action des ultrasons à savoir la fréquence, la pression, la température et le temps d'application des ultrasons.

La fréquence des ultrasons a un grand effet sur le rendement et la cinétique d'extraction, à un niveau fortement dépendant de la nature de la matière végétale à extraire. Un petit changement de la fréquence peut augmenter le rendement de l'extrait d'environ 32% pour l'extraction des pyrèthrine par hexane assistée par ultrason à partir des fleurs de pyrèthrum. Cependant, les ultrasons ont des effets faibles sur le rendement et la cinétique d'extraction d'huile à partir des graines de Guède (Romdhane and Gourdon 2002).

La distribution d'onde ultrasonique à l'intérieur d'un extracteur est également un paramètre principal dans la conception d'un extracteur ultrasonique. On observe la puissance maximum d'ultrasons à proximité de la surface de rayonnement de l'émetteur ultrasonique. L'intensité ultrasonique diminue plutôt rapidement à mesure que la distance de la surface de rayonnement augmente (en $1/\text{distance}^2$). En outre, l'intensité d'ultrasons est atténuée avec l'augmentation de la présence des particules solides (Romdhane, Gourdon et al. 1995). L'utilisation des ultrasons permet des modifications des conditions opératoires telles qu'une diminution de la température et de la pression utilisées dans les extractions sans ultrasons (Romdhane, Gourdon et al. 1995).

L'extraction par ultrason est une alternative peu coûteuse, simple et efficace aux techniques conventionnelles d'extraction. Les principaux avantages de l'utilisation des ultrasons dans l'extraction de solide-liquide incluent :

- ✚ L'augmentation de la cinétique et du rendement d'extraction,
- ✚ Réduction de la température de fonctionnement permettant l'extraction des composés thermolabiles,
- ✚ Faible coût de l'appareillage et facilité de l'opération par comparaison à d'autres nouvelles techniques d'extraction telles que l'extraction assistée par micro-ondes,
- ✚ Possibilité d'utilisation de n'importe quel solvant ce qui permet d'intervenir dans l'extraction d'une large variété de composés naturels.

Cependant, les effets des ultrasons sur l'extraction en termes de rendement et de cinétique sont liés à la nature de la matrice végétale. La présence d'une phase dispersée contribue à l'atténuation de vague d'ultrasons et la partie active des ultrasons à l'intérieur de l'extracteur est limitée à une zone située dans la proximité immédiate de l'émetteur ultrasonique. Par conséquent, ces deux facteurs doivent être considérés soigneusement dans la conception des extracteurs ultrasons.

L'extraction par ultrason a été employée pour extraire à partir des plantes des molécules actives telles que des huiles essentielles et des lipides (Chemat, Lagha et al. 2004; Li, Pordesimo et al. 2004; Luque-Garcia and Luque de Castro 2004), des suppléments diététiques (Bruni, Guerrini et al. 2002; Albu, Joyce et al. 2004), ...

Les ultrasons peuvent augmenter le rendement d'extraction. (Sharma and Gupta 2004) ont constaté que l'ultrason était un prétraitement critique pour obtenir des rendements élevés d'huiles d'amande, d'abricot et de son de riz. Le rendement d'huile extraite à partir du soja a également augmenté de manière significative en utilisant les ultrasons (Li, Pordesimo et al. 2004). Pour l'extraction par ultrason de la saponine du ginseng, le rendement total observé et le rendement de saponine ont augmenté de 15 et de 30%, respectivement.

L'extraction par ultrason a été considérée comme méthode efficace pour extraire les principes actifs à partir des *Solvia officinalis* (Salisova, Toma et al. 1997) et des fleurs d'*Hibiscus tiliaceus* L. (Melecchi, Martinez et al. 2002), des antioxydants à partir de *Rosmarinus officinalis* (Albu, Joyce et al. 2004).

ii.b. Extraction assistée par micro-ondes

Les micro-ondes sont des rayonnements électromagnétiques de fréquence allant de 0.3 à 300 GHz. Les micro-ondes domestiques et industrielles fonctionnent généralement à 2.45 GHz, mais sont également utilisées à 0.915 GHz aux Etats-Unis et à 0.896 GHz en Europe. Les micro-ondes peuvent pénétrer les matières biologiques et agir sur les molécules polaires telles que l'eau pour leur communiquer un mouvement de fluctuation ce qui se traduit donc par une augmentation de la température de la matière en question à la profondeur de pénétration.

L'extraction assistée par Micro-ondes (EAM) offre un transfert rapide d'énergie et un chauffage simultané de l'ensemble « solvant et matrice végétale solide ». En absorbant l'énergie des micro-ondes, l'eau présente dans la matrice végétale favorise la rupture des cellules facilitant ainsi la libération des produits chimiques de la matrice et améliorant leur extraction (Kaufmann, Christen et al. 2001).

Kratchanova, Pavlova et al., 2004 ont observé à l'aide de la microscopie électronique à balayage que le prétraitement par micro-ondes des peaux fraîches d'orange a mené à des changements destructifs du tissu végétal. Ces changements du tissu végétal dus au chauffage par micro-ondes ont donné une augmentation considérable du rendement de pectine extractible. En outre, la migration des ions dissous a augmenté la pénétration du solvant dans la matrice et a ainsi facilité la récupération des pectines. L'effet de l'énergie des micro-ondes dépend ainsi fortement des caractéristiques diélectriques de la matrice solide et du solvant.

Il existe deux types de systèmes disponibles d'EAM dans le commerce : les enceintes d'extraction fermées sous pression et température contrôlées, et les fours à micro-ondes à pression atmosphérique (Kaufmann and Christen 2002). Les enceintes fermées sont généralement utilisées pour l'extraction dans des conditions spécifiques telles que des températures élevées d'extraction. La pression dans l'enceinte dépend essentiellement du volume et du point d'ébullition du solvant. Le four à micro ondes peut être actionné à une température maximale déterminée par le point d'ébullition du solvant à la pression atmosphérique. Ericsson and Colmsjo, 2000 ont introduit un système dynamique d'EAM qu'ils ont testé sur un matériel standard et qui a permis de donner un rendement équivalent que par Soxhlet mais en un temps beaucoup plus réduit.

Etant donné que l'EAM dépend de la propriété diélectrique du solvant et de la matrice, de meilleurs résultats peuvent être obtenus en humidifiant des échantillons d'une substance qui possède une constante diélectrique relativement élevée telle que l'eau. Si une matière biologique sèche est réhydratée avant l'extraction, la matrice elle-même peut agir ainsi avec les micro-ondes et par conséquent faciliter le processus de chauffage. Le chauffage par micro-ondes mène à l'expansion et à la rupture des parois cellulaires et est suivi de la libération des molécules à extraire dans le solvant (Spar Eskilsson and Bjorklund 2000). Dans ce cas, le solvant environnant peut avoir une faible constante diélectrique et reste alors froid pendant l'extraction. Cette méthode peut être employée pour extraire les composés thermosensibles tels que les huiles essentielles (Brachet, Christen et al. 2002).

Cependant, on a constaté qu'il était impossible d'exécuter une bonne EAM, tant pour des échantillons complètement secs que pour les échantillons très humides, quand un

solvant apolaire, tel que l'hexane avait été employé pour l'extraction (Molins, Hogendoorn et al. 1997).

La taille et la distribution de taille des particules ont habituellement une influence significative sur l'efficacité d'EAM. Les dimensions particulières des matériaux à extraire sont habituellement dans la gamme de 100 µm à 2 mm (Spar Eskinsson and Bjorklund 2000). Or, plus la poudre est fine, plus l'extraction est facilitée à travers l'amélioration de la diffusion des produits à extraire hors de la matrice végétale et l'augmentation de la surface spécifique ce qui assure un meilleur contact entre la matrice solide et le solvant. Le choix du solvant pour l'EAM est fonction de la solubilité des extraits d'intérêt, par l'interaction entre le solvant et la matrice végétale, et finalement par les propriétés absorbantes de micro-ondes du solvant, déterminé par sa constante diélectrique. Csiktusnadi Kiss, Forgacs et al., 2000 ont étudié l'efficacité et la sélectivité de l'EAM pour l'extraction des colorants de poudre de paprika en utilisant 30 mélanges de solvants d'extraction. Leurs résultats ont prouvé que l'efficacité et la sélectivité de l'EAM dépendent de manière significative de la constante diélectrique du solvant d'extraction. Des solvants comme l'éthanol, le méthanol ou l'eau sont suffisamment polaires pour être chauffés par micro-ondes.

La température est un autre facteur important contribuant à l'amélioration du rendement. Généralement, les températures élevées permettent d'améliorer l'efficacité de l'extraction avec, pour limites, les températures de dégradation des extraits. Dans ce cas-ci, la puissance utilisée lors l'EAM doit être choisie correctement pour éviter les températures excessives, menant à une éventuelle dégradation des composés dissous.

L'EAM a été considérée en tant qu'alternative à l'extraction solide-liquide traditionnelle des métabolites pour plusieurs raisons :

- + La réduction du temps d'extraction,
- + La réduction de la quantité de solvant utilisée,
- + L'amélioration du rendement d'extraction.

Par comparaison avec d'autres techniques modernes d'extraction telles que l'extraction par fluide supercritique, l'EAM présente les avantages de la simplicité d'utilisation et du faible coût.

L'EAM (méthanol à 80%) pourrait nettement réduire le temps d'extraction des saponines de ginseng de 12 h, avec des méthodes conventionnelles d'extraction, à quelques secondes (Kwon, Belanger et al. 2003).

Pour l'extraction des polyphénols et de la caféine des feuilles de thé vert, un plus grand rendement d'extraction a été obtenu avec 4 minutes pour l'EAM comparé à 20 h avec une extraction à température ambiante, 90 minutes avec l'extraction assistée par ultrason et 45 minutes pour l'extraction à reflux (Pan, Niu et al. 2003).

ii.c. Extraction par fluide supercritique

L'état supercritique d'un fluide est obtenu en menant le gaz au-dessus de sa température critique ou en comprimant le liquide au-delà de sa pression critique. La température critique est la température au-delà de laquelle la phase liquide de la substance ne peut pas exister, quelle que soit la pression ; la pression de vapeur à la température critique est la pression critique.

Comparé aux solvants liquides, les fluides supercritiques ont plusieurs avantages principaux : (1) la puissance de dissolution d'un solvant liquide supercritique dépend de sa densité, qui est fortement réglable en changeant la pression ou/et la température ; (2)

le fluide supercritique a un coefficient de diffusion plus élevé et une tension superficielle plus faible ainsi qu'une viscosité inférieure à celle d'un solvant liquide, menant à un transfert de masse plus favorable.

Un système d'extraction par fluide supercritique (EFS) est montré dans la Figure I-3. Pendant l'EFS, la matière végétale est chargée dans un extracteur, équipé de capteurs de température et de soupapes de pression, à l'admission et à la sortie de l'extracteur, pour contrôler les paramètres d'extraction. Le réacteur d'extraction est pressurisé avec le fluide par une pompe. Le fluide et les composés extraits sont transportés vers les séparateurs, où le pouvoir solvant du fluide est diminué en diminuant sa pression ou en augmentant sa température. Le produit est alors récupéré par l'intermédiaire d'une valve située dans la partie la plus inférieure des séparateurs. Le fluide, quand à lui, est régénéré et recyclé (Sihvonen, Jarvenpaa et al. 1999).

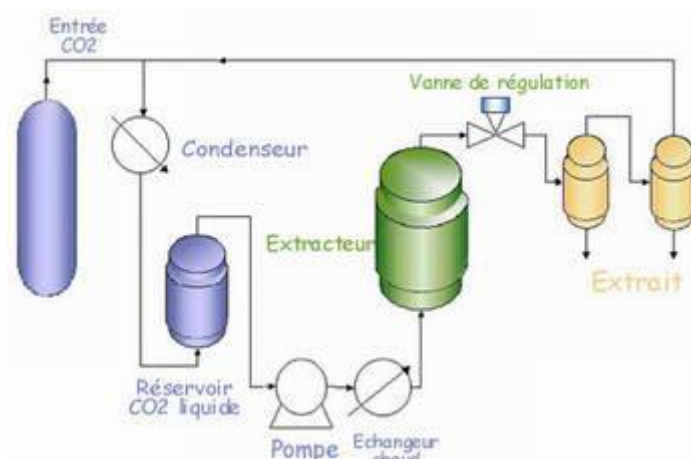


Figure I-3 : représentation schématique d'un extracteur par fluide supercritique (Wang and Weller 2006)

Pour développer une EFS réussie, plusieurs facteurs doivent être pris en compte. Ces facteurs incluent :

- ✚ le choix du fluide,
- ✚ la préparation de la matière végétale
- ✚ la définition des conditions d'extraction.

Le choix des fluides supercritiques est très important pour le développement d'un processus d'EFS. Le dioxyde de carbone supercritique est le plus communément utilisé (Hurren 1999) en raison de son domaine de température et pression critiques (31°C - 304 K et 7.3 MPa), de ses propriétés inertes et ininflammable, de sa faible toxicité et réactivité, de sa haute pureté à faible coût et enfin des restrictions dans l'utilisation d'autres solvants organiques. Pourtant, le CO₂ supercritique n'est efficace que pour l'extraction des molécules apolaires telles que les hydrocarbures et par conséquent ne convient pas pour les molécules polaires. Pour extraire les composés polaires, certains fluides supercritiques polaires tels que le Fréon-22, le protoxyde d'azote et l'hexane ont été utilisés. Cependant, leurs applications sont limitées à cause des risques de sûreté et des considérations environnementales. Bien que l'eau supercritique et l'eau surchauffée aient certains avantages, tels que les grandes capacités d'extraction des composés polaires, elles ne sont pas appropriées aux composés thermolabiles (Lang and Wai 2001).

Beaucoup de métabolites tels que les composés phénoliques, les alcaloïdes et les composés glycosidiques sont donc très peu solubles dans le dioxyde de carbone et par conséquent non extractibles. Des techniques visant de surmonter la solubilité limitée des

substances polaires dans le CO₂ supercritique ont été proposées. L'addition des Co-solvants polaires (modificateurs) au CO₂ supercritique est connue pour augmenter de manière significative la solubilité des composés polaires. Parmi tous les modificateurs comprenant le méthanol, l'éthanol, l'acétonitrile, l'acétone, l'eau, l'éther éthylique et le dichlorométhane, le méthanol est généralement le plus utilisé car il a été prouvé le plus efficace et est miscible (jusqu'à 20%) avec le CO₂. Cependant, l'éthanol peut être une meilleure alternative dans l'EFS des métabolites végétaux en raison de sa faible toxicité (Hamburger, Baumann et al. 2004).

Quand des matières végétales fraîches sont extraites, la haute teneur en eau peut occasionner des difficultés mécaniques telles l'obstruction par givrage des conduites. Bien que l'eau soit seulement environ 0.3% soluble avec le CO₂ supercritique, les corps extraits, fortement hydrosolubles, se retrouvaient préférentiellement dans la phase aqueuse, diminuant ainsi l'efficacité de l'EFS. Certains produits chimiques tels que le NaC₂SO₄, et le gel de silice sont ainsi mélangés aux matières végétales pour retenir l'humidité de la matière fraîche lors de l'EFS (Lang and Wai 2001).

Le temps d'extraction a été prouvé comme étant un paramètre qui détermine la composition en extrait. Les composés à faible poids moléculaire et apolaires sont extraits aisément par CO₂ supercritique puisque le mécanisme d'extraction est habituellement limité par la diffusion interne.

L'EFS offre des possibilités peu communes pour les extractions et les fractionnements sélectifs parce que la solubilité d'un produit chimique dans un fluide supercritique peut être manœuvrée en changeant la pression et/ou la température du fluide. En outre, les fluides supercritiques ont la densité d'un liquide et peuvent solubiliser un solide comme un solvant liquide. La solubilité d'un solide dans un fluide supercritique augmente avec la densité du fluide, qui peut être obtenue à pression élevée. Les composés dissous peuvent être séparés du fluide par la réduction de la densité du fluide supercritique, en abaissant la pression (Poiana, Sicari et al. 1998).

Par conséquent, en utilisant l'EFS le processus de concentration est éliminé, étape habituellement lente. En outre, les substances dissoutes peuvent être séparées d'un solvant supercritique sans perte de composés volatiles dus à la volatilité extrême du fluide supercritique. En plus, la diffusivité d'un fluide supercritique est une à deux fois plus élevée que celle de solvants liquides, ce qui a pour conséquence un rendement d'extraction plus grand que celui réalisé par les solvants conventionnels.

L'EFS est une alternative potentielle aux méthodes conventionnelles d'extraction pour extraire les composants biologiquement actifs à partir des plantes. Elle a été employée pour extraire divers métabolites végétaux, particulièrement les lipides (Bernardo-Gil, Grenha et al. 2002), les huiles essentielles et les arômes (Wang and Weller 2006).

ii.d. Extraction par solvant accéléré

L'extraction par solvant accélérée (ESA) est un processus d'extraction solide-liquide effectué à température élevée, habituellement entre 50 et 200 °C et aux pressions entre 10 et 15 MPa. Par conséquent, l'extraction par solvant accéléré est une forme d'extraction par solvant pressurisé qui est tout à fait semblable à l'EFS. L'extraction est effectuée sous pression afin de maintenir le solvant dans son état liquide à température élevée. Le solvant est toujours au-dessous de son état critique pendant l'ESA. La

température élevée accélère la cinétique d'extraction et la pression élevée maintient le solvant à l'état liquide, réalisant ainsi une extraction efficace et rapide. En outre, la pression permet à la cellule d'extraction d'être remplie plus rapidement et aide à forcer le liquide dans la matrice solide. Les températures élevées augmentent la diffusivité du solvant améliorant par conséquent la cinétique d'extraction (Brachet, Rudaz et al. 2001).

Bien que le solvant utilisé dans l'ESA soit habituellement les solvants organiques, l'eau chaude pressurisée, ou l'eau sous-critique peuvent également être employées dans un appareillage d'ESA.

L'utilisation des solvants non-toxiques, tels que le dioxyde de carbone et l'eau, présente des avantages économiques et environnementaux. Il a été rapporté que l'extraction supercritique par CO₂ est une technique nouvelle pour l'extraction des métabolites d'origine végétale. Cependant, une quantité considérable de modificateur polaire doit être ajoutée au dioxyde de carbone pour extraire les composés polaires. L'extraction par solvants accélérée est considérée comme une technique alternative et potentielle à l'EFS pour l'extraction des composés polaires (Brachet, Rudaz et al. 2001).

Comparée à l'extraction traditionnelle par Soxhlet, l'ESA implique une grande diminution de la quantité de solvant et du temps d'extraction.

L'extraction par solvant accéléré est habituellement employée pour l'extraction des polluants organiques stables à hautes températures à partir des matrices environnementales. Très peu d'applications d'extraction par solvant accéléré ont été rapportées dans le domaine des molécules végétales.

L'extraction par solvants accélérée a été développée pour l'extraction rapide de la cocaïne et le benzoylecgonine des feuilles du coca en utilisant le méthanol comme solvant. La pression, la température, le temps d'extraction et la dimension particulière optimaux sont respectivement 20 MPa, 80°C, 10 minutes et 90-150 µm (Brachet, Rudaz et al. 2001).

Les procédés d'extraction assistés par ultrason, assistés par micro-ondes, par fluides supercritiques et par solvants accélérés sont très prometteurs pour l'extraction de principes actifs à partir des végétaux. Cependant, la plupart de ces nouvelles techniques d'extraction ne sont encore conduites avec succès qu'à l'échelle laboratoire ou à l'échelle pilote et leurs applications industrielles restent cependant relativement limitées. Il faudrait encore plus de recherche pour exploiter le grand potentiel réel de ces nouvelles techniques d'extraction à l'échelle industrielle.

CHAPITRE I-2.

OPÉRATIONS DE PRÉTRAITEMENT

Toute opération d'extraction solide-liquide est précédée d'une ou plusieurs opérations de préparations ou de prétraitement. Les opérations extractives peuvent, suivant les cas, se dérouler soit sur du matériel végétal frais, soit sur des plantes sèches.

I-2.1. LE SECHAGE

La plante fraîche renferme une importante proportion d'eau, celle-ci varie suivant la nature des organes considérés (plante entière, tige, fleurs, racines, graines etc.). De plus, la plante comme tout organisme vivant contient de nombreuses enzymes. Ces enzymes, à la mort de la plante et s'ils sont maintenus en milieu aqueux, vont entraîner de nombreuses réactions de dégradation, qui ne seront plus compensées par des synthèses au sein de la cellule végétale, il s'ensuit donc une détérioration rapide du contenu cellulaire et par voie de conséquence une altération des principes actifs s'y trouvant.

L'eau contenue dans la plante permet l'activation des systèmes enzymatiques ; pour les stopper deux grands principes peuvent être utilisés :

I-2.1.a. L'INHIBITION

L'inhibition enzymatique peut être obtenue en diminuant la teneur en eau de la plante ; on peut obtenir ce résultat par différents procédés :

- ✚ Dessiccation à l'air libre et au soleil.
- ✚ Dessiccation à l'ombre et sous abri.
- ✚ Dessiccation par l'air sec et chaud.
- ✚ Dessiccation par les rayons infrarouges.
- ✚ Dessiccation à l'étuve et sous vide.
- ✚ Cryodessiccation ou lyophilisation.
- ✚ Dessiccation par le froid.
- ✚ Dessiccation par trituration avec des sels neutres, des sucres.

Il existe donc une multitude de procédés ayant chacun leurs avantages et leurs inconvénients. Dans la pratique courante, le séchage simple est le plus souvent réalisé, séchage sur des claies grillagées dans des endroits frais et bien aérés.(Groubert 1984).

I-2.1.b. L'INACTIVATION

La dénaturation totale des enzymes de la plante a pour but de stabiliser sa composition chimique et d'éviter ainsi la destruction par différentes réactions enzymatiques de certains composés fragiles comme, par exemple, les hétérosides qui sont facilement hydrolysables, ou même des réactions de polymérisation ou d'oxydation. On a donné le nom de stabilisation à cette dénaturation irréversible.

Les différents procédés utilisés sont énumérés ci dessous :

- ✚ Stabilisation par les courants de haute fréquence.
- ✚ Stabilisation par l'alcool bouillant.
- ✚ Stabilisation par la chaleur humide.

- ✓ Soit la vapeur d'eau.
- ✓ Soit la vapeur d'alcool.
- + Stabilisation par la chaleur sèche.
- + Stabilisation par les rayons ultraviolets.

I-2.2. LE BROYAGE

I-2.2.a. GENERALITES

Le broyage vise à diviser la matière pour augmenter la surface d'échange entre le solide et le solvant d'extraction et à faciliter l'extraction de l'intérieur des tissus végétaux par cassure des tissus et des parois cellulaires.

La division mécanique d'une particule solide peut être réalisée suivant différents procédés ; par compression, percussion ou choc, abrasion ou encore par frottement, cisaillement, arrachement. Ici encore, le broyage peut, dans certains cas, en raison de l'abrasion ou le frottement, entraîner une augmentation de température capable de détruire ou de dénaturer les molécules actives. (Groubert 1984).

Même quand il est réalisé à un degré très fin, le broyage n'implique aucune rupture conséquent des parois cellulaires ; il n'induit donc pas d'augmentation du degré de disponibilité des composés actifs recherchés.

On distinguera les appareils utilisés dans l'industrie et ceux utilisés dans les laboratoires.

I-2.2.b. EQUIPEMENTS ET APPAREILS

I-2.2.b.i. Equipement de laboratoire

Le mortier classique en porcelaine est à la base du broyage à l'échelle du laboratoire, mais n'est utilisé que pour des solides relativement friables.

Les broyeurs à hélice, de type « moulin à café électrique » ou « mixer », donnent de bons résultats dans l'ensemble ; ils sont d'une utilisation pratique, faciles à nettoyer. Le seul inconvénient est que leur capacité est assez restreinte et ils ne peuvent broyer des parties coriaces comme par exemple les grosses racines végétales. Ces broyeurs à hélice peuvent être utilisés soit en milieu sec (broyage classique), soit en milieu humide ou liquide. Cette dernière opération permet de réaliser le broyage d'éléments coriaces qui sont ainsi trempés et rendu plus friables.

Les moulins de type moulin à poivre, permettent de broyer des organes très robustes ; ils sont cependant limités par leur faible contenance (Groubert 1984).

I-2.2.b.ii. Les appareils industriels

Ils sont conçus suivant différents principes :

- + Les meules : du type meule de moulins pour céréales verticales ou horizontales.
- + Le concasseur à mâchoire : les mouvements sont réglés par un excentrique qui diminue rythmiquement l'espace qui sépare les mâchoires entre lesquelles le produit à broyer doit passer.
- + Les broyeurs à cylindre, cannelés ou non : la grosseur des particules est réglée par l'écartement des deux cylindres dont les cannelures viennent s'emboîter en tournant. Des substances sont entraînées et écrasées dans l'intervalle qui les sépare.

✚ Il existe également des broyeurs à dents ou à pointes, des broyeurs à marteaux, des broyeurs ou moulins à boulets (Groubert 1984).

I-2.3. TRAITEMENT ENZYMATIQUE

Une enzyme est une protéine permettant de catalyser une réaction chimique. Comme tout catalyseur, elle n'intervient pas dans le processus réactionnel et se retrouve intacte à la fin de la réaction. Chaque réaction a sa propre enzyme spécifique qui catalyse toujours la même transformation sur les mêmes corps chimiques.

La réaction des enzymes (pectinase, cellulase) est souvent considérée comme une alternative à la destruction thermo-mécanique des parois cellulaires ; elle est souvent réalisée à une température modérée voire ambiante.

Cette technique a été utilisée pour faciliter l'extraction du jus de pomme, l'huile de soja (Rosenthal, Pyle et al. 2001), l'huile d'arachide (Sharma, Khare et al. 2002), et dans plusieurs autres applications (Shah, Sharma et al. 2005).

Ce traitement présente des inconvénients tels que le temps de traitement assez long, la dégradation de la qualité de l'extrait et la faible disponibilité sur le marché de certaines enzymes dont le coût est alors élevé.

I-2.4. TRAITEMENT PAR CHAMP ÉLECTRIQUE

Dans le même objectif toujours de dénaturer la paroi cellulaire, le traitement par champ électrique a été proposé. Au début le traitement a consisté en un chauffage ohmique dont la plupart des applications se sont orientées vers le domaine agroalimentaire. L'amélioration de la diffusion du contenu du protoplasme sous l'effet d'un champ électrique est l'une de ces applications (El belghiti 2005).

Les principales applications de ce traitement ont concerné le domaine d'extraction des sucres à partir des cossettes de betterave (Bazhal and Kupshik 1983; El belghiti 2005). Le jus ainsi extrait par chauffage ohmique est de qualité supérieure à celui issu d'un par traitement thermique.

La technique de traitement par champ électrique pulsée qui est une variante de ce type de traitement, a été appliquée au départ en génie génétique afin de perforer les membranes cellulaires de certains microorganismes, et s'est, par la suite, élargie au domaine agroalimentaire (El belghiti 2005).

Toutes ces différentes techniques de prétraitement, présentent leurs limites et aucune de ces améliorations n'a amené une réponse complètement satisfaisante.

CHAPITRE I-3.

APPROCHE FONDAMENTALE DES PROCESSUS

Comme nous l'avons déjà signalé en §I-1.1.b ; les mécanismes de l'extraction et d'interaction solide/liquide (solvant) se traduisent par quatre processus successifs de :

1. « transfert » du solvant au sein de la matrice solide, ce qui pourrait faire intervenir, en plus de la diffusion proprement dite, des phénomènes complexes de capillarité, etc.,
2. dissolution du soluté dans le solvant ; il s'agit donc de mettre en solution les divers composés en s'approchant, en terme de concentration, de l'état d'équilibre qui est fonction de la nature du composé, du solvant et de la température,
3. diffusion du soluté dissous dans la solution et sa migration de l'intérieur (surface d'interaction entre le solvant et les divers points de la matrice solide) et la surface externe,
4. transfert (par diffusion, mais nettement plus généralement par convection, agitation, etc.) du soluté dans la masse liquide extérieure restante du solvant.

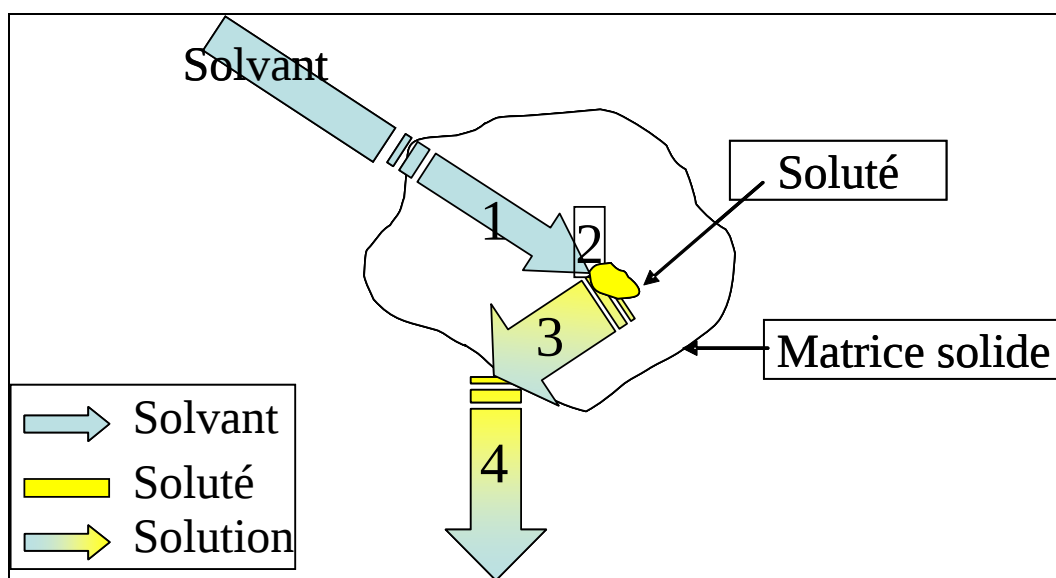


Figure I-4 : Schéma des principales étapes ayant lieu lors de l'opération d'extraction solide-liquide.

La vitesse et la cinétique de ces divers processus intervenant d'une façon successive évoluent différemment selon les conditions opératoires incluant la nature du solvant, la température à laquelle se déroule l'opération, les molécules à extraire (soluté), la structure de la matière solide, l'agitation et le type des ressources mécaniques et/ou thermiques (micro-ondes, etc.), etc. L'opération a ainsi pour processus limitant, schématiquement le processus le plus lent.

Nous avons donc tenu à réaliser une approche globale spécifique permettant une estimation approximative de l'ordre de grandeur de la vitesse en vue d'identifier l'impact des phénomènes ayant ainsi lieu et de déterminer le processus limitant. C'est ainsi que l'on pourra établir une base d'intensification du processus en question.

I-3.1. IDENTIFICATION ET INTENSIFICATION DU PROCESSUS LIMITANT

L'objectif que nous nous sommes fixé à partir de l'étude de la cinétique d'extraction par solvant est de type principalement comparatif ; l'analyse de cette cinétique doit viser une compréhension fondamentale éventuellement simplifiée des phénomènes intervenant au cours des diverses étapes du procédé. Dans la situation actuelle, nous avons opté pour la définition des opérations d'intensification du processus réellement limitant. Nous proposons ainsi d'analyser les quatre principaux processus intervenant au cours de l'opération selon l'ordre suivant :

1. La mise en solution des solutés,
2. Le transfert du soluté de la surface de la matrice solide dans le milieu extérieur,
3. La diffusion d'une part 3-a) du solvant liquide au sein de la matrice « végétale » solide, puis 3-b) des molécules extraites (soluté) dans le solvant de l'intérieur vers la surface.

I-3.1.a. SOLUBILISATION DES MOLECULES A EXTRAIRE DANS LE SOLVANT LIQUIDE

La mise en solution est une opération qui, en visant l'équilibre thermodynamique en terme de concentration, permet de dissoudre dans le solvant un ou plusieurs composés du tissu végétal. L'équilibre est décrit par la constante ou le coefficient « m » de distribution ou de partage à l'équilibre, qui est une fonction de la capacité maximale de solubilisation induisant ainsi une concentration à l'équilibre entre l'extrait et la matière sèche (Gertenbach, 2001 ; Schwartzberg and Chao 1982). Plus la valeur de « m » est grande, plus est facile la mise en solution du composé indiqué dans le solvant. La valeur de « m » est fonction des caractéristiques du solvant, du composé à extraire ainsi que de la température.

Dans l'opération d'extraction, la mise en solution des molécules à extraire (soluté) peut facilement être processus limitant ; il suffirait d'avoir choisi un mauvais solvant et une mauvaise température de l'opération. Dans une telle situation caractérisée par une très faible solubilisation du soluté dans le solvant liquide, le solvant entrerait relativement aisément dans la matrice solide, le gradient de concentration en soluté dans la matrice solide et dans le milieu extérieur finirait par tendre vers zéro et le processus d'extraction serait donc complètement gouverné par la solubilisation du soluté dans le solvant.

L'intensification d'une telle situation consiste « tout simplement » à réaliser un choix « convenable » tout autant du solvant que de la température de l'opération ; cette dernière devrait souvent être la plus élevée possible tout en étant en dessous de la température d'ébullition et du domaine de dégradation des molécules à extraire. Le choix du solvant et de la température de l'extraction est généralement effectué en vue d'aboutir à une bonne mise en solution, en termes de cinétique et de quantité dissoute ; il est généralement réalisé en fonction des solutés visés et de la nature de la plante et des variétés. Il est ainsi systématiquement possible d'avoir une cinétique de cette étape relativement assez forte pour qu'elle ne soit jamais le processus limitant. Le processus de « solubilisation » du principe actif recherché n'est généralement pas limitant, bien au contraire, il pourra souvent être pratiquement considéré en tant que processus immédiat (très rapide).

I-3.1.b. TRANSFERT DU SOLUTE DISSOUS VERS L'EXTERIEUR

Dans le milieu extérieur, le transfert du soluté peut tout autant avoir lieu par diffusion que par convection. En l'absence de tout phénomène d'agitation par exemple, il se peut

que le processus limitant de l'opération d'extraction soit le transfert du soluté de la surface du solide loin vers le solvant extérieur. Dans une telle situation, le solvant aurait rapidement pénétré la matrice solide et dissout le soluté ; la concentration du soluté à l'intérieur du solide serait homogène. Là, l'opération d'extraction s'opérerait à la vitesse de la diffusion du soluté de la surface externe du solide loin dans le solvant environnant.

Pour palier à ce « problème » et opérer une intensification adéquate, il faudrait modifier la nature du transfert du soluté dans le milieu extérieur pour qu'il ne soit plus de type diffusionnel mais plutôt convectif ; il suffit alors de réaliser une « bonne » agitation du milieu « solvant » extérieur. La résistance externe au transfert devient ainsi négligeable.

La quantification de l'impact de l'agitation est traduite par le nombre de Biot dont la valeur donne une idée sur l'état d'homogénéité du système :

Équation I-5/
$$Bi = \frac{k.l}{D_s}$$

Où,

k : Coefficient de transfert (m/s)

l : Taille caractéristique de particules (épaisseur/2) (m)

D_s : Coefficient de diffusion du soluté (m²/s)

En pratique, le nombre de Biot est le plus souvent supérieur à 200 ; on peut donc ainsi négliger la résistance au transfert à l'interface par rapport à celle à l'intérieur du solide. C'est pour cette raison que l'extraction est souvent effectuée en présence d'agitation (Schwartzberg and Chao 1982).

I-3.1.c. LES TRANSFERTS PAR DIFFUSION

Nous avons noté la présence de deux types de transfert diffusionnel et leur importance dans toute étude cinétique concernant l'extraction aux deux plans d'interaction solide/liquide et liquide/liquide ; une analyse de la diffusion Fickéenne sous sa forme la plus générale semble ainsi indispensable.

En effet, le transfert de masse peut généralement être effectué soit par convection, soit par diffusion. Lors de l'opération de diffusion, c'est le mouvement aléatoire des molécules qui assure le transfert avec, pour élément moteur, le gradient de la concentration. Ces processus, ayant lieu au sein de la matrice solide, ne peuvent pas être intensifiés à travers une quelconque modification thermique ou mécanique externe. En effet, dans les phénomènes de lixiviation, l'intérieur du solide ne peut pas être agité, et les phénomènes de turbulence ont peu de chance de se produire dans les petits capillaires ou pores, ce qui explique les raisons pour lesquelles la diffusion se présente comme le phénomène majeur de transport (Aguillera and Stanley 1999) au sein de la matrice solide.

Les phénomènes diffusionnels interviennent donc dans le transfert des solutés extraits (solubilisés) au sein du solvant présent dans la matrice solide et dans le transfert du solvant vers l'intérieur de la matrice solide (interaction solide/liquide). Les deux processus dépendent de la porosité du matériel.

I-3.1.c.i. Diffusion du soluté dans le solvant au sein de la matrice solide

Au sein de la matrice solide, les molécules que le solvant a solubilisées doivent leur « mouvement » dans le solvant grâce à une diffusion de type Fickéenne dont l'élément moteur est le gradient de concentration de chacune de ces molécules ; la première loi de

FICK fait alors intervenir la diffusivité propre de chacune de ces molécules dans le solvant. Selon la formulation de ALLAF, qui a l'avantage de simplifier l'insertion du mouvement du solvant au sein de la matrice solide souvent supposée immobile, nous pourrions écrire :

$$\text{Équation I-6 /} \quad \frac{\rho_e}{\rho_s} (\vec{v}_e - \vec{v}_s) = -D_{e-s} \text{grad} \left(\frac{\rho_e}{\rho_s} \right)$$

Avec :

- ρ_e : masse par unité de volume de l'ensemble des molécules solubles dans le solvant (en kg.m^{-3}),
- ρ_s : masse par unité de volume du solvant (en kg.m^{-3}).
- v_e : vitesse moyenne absolue de l'ensemble des molécules solubles dans le solvant (en m.s^{-1}).
- v_s : vitesse moyenne absolue du solvant dans la matrice solide (en m.s^{-1}).
- D_{e-s} : Diffusivité de l'extrait au sein du solvant (en $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$).

Une corrélation empirique a été proposée par WILKE et CHANG pour l'estimation de la diffusivité de l'extrait au sein du solvant (en $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$), établie pour des solutions diluées.

$$\text{Équation I-7/} \quad D_{js} = 0,89.10^{-5} \frac{(\phi_s M_s)^{0,5} RT}{\mu v_j^{0,6}}.$$

Avec :

- D_{js} : (en $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) Coefficient de diffusion du constituant j dans le solvant S .
- M_s : Masse molaire du solvant (g.mol^{-1}).
- R : constante des gaz parfaits.
- T : en Kelvin.
- μ : viscosité du solvant (en kg/m.s)
- v_j : volume molaire du constituant j (m^3/mol)

Tableau I-2 : valeur de la constante Φ_s dans quelques cas particuliers.

	eau	méthanol	éthanol	benzène
$\phi_s =$	2,6	1,9	1,5	1,0

Il s'agit de procéder à une présentation des lois de transfert de la matière.

I-3.1.c.ii. Diffusion du solvant liquide dans la matrice solide

Le processus de transfert du solvant au sein du milieu poreux et éventuellement alvéolé a lieu selon des processus divers de diffusion liquide-solide, capillarité, osmose, etc. Dans de nombreux cas, la matrice solide proprement dite peut être supposée homogène, mais rarement isotrope. Seule, la distribution statistique permet d'adopter une telle hypothèse.

La diffusion de Fick peut souvent être adoptée avec un coefficient (dit diffusivité du solvant dans la structure de la matrice solide D_{s-m}) ; la formulation de ALLAF permet d'écrire :

$$\text{Équation I-8/} \quad \frac{\rho_s}{\rho_m} (\vec{v}_s - \vec{v}_m) = -D_{s-m} \text{grad} \left(\frac{\rho_s}{\rho_m} \right)$$

Avec :

ρ_s : masse par unité de volume du solvant (kg.m^{-3}),

ρ_m : masse par unité de volume de la matrice solide du milieu poreux (kg.m^{-3}).

V_s : vitesse moyenne absolue du solvant dans la matrice solide du milieu poreux (m.s^{-1}).

v_m : vitesse moyenne absolue de la matrice solide (en m.s^{-1}).

D_{s-m} : Diffusivité du solvant dans la matrice solide du milieu poreux (en $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$).

Or, on peut aisément justifier l'hypothèse simplificatrice d'un transfert intervenant dans une matrice solide supposée immobile. On peut également négliger les phénomènes de gonflement ou de retrait par mouillage, ce qui permet de supposer négligeable l'évolution de la masse volumique de la matrice solide du milieu poreux (kg.m^{-3}) dans le temps malgré le phénomène d'extraction qui a cependant lieu :

Équation I-9 /
$$\rho_s \vec{v}_s = -D_{s-m} \overrightarrow{\text{grad}} \rho_s$$

Quand on considère le cas d'un flux unidirectionnel du solvant selon l'axe Ox, il est possible d'établir :

Équation I-10 /
$$\rho_s v_s = -D_{s-m} \frac{d\rho_s}{dx}$$

La conservation de la masse et la continuité permettent d'établir alors une loi d'évolution de la concentration dite « la deuxième loi de Fick » selon la forme suivante :

Équation I-11 /
$$\frac{\partial \rho_s}{\partial t} = \text{div} \left[D_{s-m} \overrightarrow{\text{grad}} \rho_s \right]$$

Où t est le temps.

L'hypothèse d'une diffusivité D_{s-m} constante n'est émise qu'en vertu d'une homogénéité à la fois structurelle et thermique. En effet, D_{s-m} varie considérablement en fonction de la température et de la porosité du système. Une approche physique quantifiée et une analyse expérimentale adéquate sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse. On pourra alors écrire la seconde loi de Fick :

Équation I-12 /
$$\frac{\partial \rho_s}{\partial t} = D_{s-m} * \text{div} \left[\overrightarrow{\text{grad}} \rho_s \right]$$

Dans le cas d'un flux unidirectionnel et dans l'hypothèse d'une diffusivité D_{s-m} constante (hypothèse vérifiée dans le paragraphe I.3.4.b.ii), on aboutit à l'équation suivante :

Équation I-13 /
$$\frac{\partial \rho_s}{\partial t} = \left[D_{s-m} \frac{d^2 \rho_s}{dx^2} \right]$$

I-3.2. PHENOMENE LIMITANT

Il découle de l'analyse des quatre processus régissant l'opération d'extraction, que les deux processus diffusionnels sont généralement les étapes limitantes. Cependant, il n'est pas aisé de quantifier séparément les deux phénomènes, vu leur intervention simultanée et leur dépendance étroite vis-à-vis de la structure (porosité, etc.) et de la température. Notons cependant que dans le cas d'une matrice solide immobile, la diffusivité du solvant dans la matrice solide est, généralement, nettement plus faible que

celle des solutés dans le solvant. Ainsi, malgré les similitudes dans le comportement des deux coefficients de diffusion en question, BENAMOR et ALLAF notent que dans la zone à forte teneur en humidité des produits biologiques structurés naturels, D_{s-m} varie de 10^{-12} à $10^{-10} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$, alors que, d'après les données bibliographiques, la diffusivité de nombreuses molécules à la suite de leur solubilisation dans les solvants est voisine de $10^{-9} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ (Shwartzberg and Chao, 1982).

Les deux diffusivités en question évoluent en effet en fonction de la température avec des expressions distinctes ($D_{e-s}=f(T)$ et $D_{s-m}=f(T)$) de type :

Équation I-14/
$$D=A.\exp (-B/T)= A.\exp (-E_a/RT).$$

Les auteurs proposent ainsi d'étudier systématiquement une diffusivité globale du phénomène, prenant en compte la diffusion du solvant à travers la matrice solide et la diffusion du soluté dans le solvant. Une modélisation empirique similaire à la formulation de Fick est alors adoptée avec une diffusivité équivalente, appelée diffusivité efficace, effective ou apparente (D_{eff}).

Plusieurs études expérimentales ont été réalisées afin de quantifier le coefficient D_{eff} de diverses opérations d'extraction pour différents solutés. Malgré un abus de langage attribuant cette diffusivité à la « diffusion du soluté dans le solvant », l'analyse précise des documents montre aisément que D_{eff} tient systématiquement également compte de la diffusion du solvant dans la matrice.

Pour l'extraction des composés phénoliques dans le cassis, Cacace et Mazza, 2003 ont trouvé des valeurs de D_{eff} variant de $2,43 \times 10^{-10}$ à $1,23 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ à 40°C pour différentes concentrations d'éthanol et de sulfure. Pour l'extraction des sucres à partir des cosse de caroube, Mulet et al., 1988 trouvent des valeurs de D_{eff} allant de 0,87 à $1,5 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ pour des températures variant entre $20-50^\circ\text{C}$.

Une analyse bibliographique montre que la diffusivité effective D_{eff} de l'ensemble de l'opération d'extraction et la diffusivité des liquides seuls D_{s-m} (eau dans les processus de réhydratation, etc.) dans les matrices végétales solides ont le même ordre de grandeur (voir Tableau I-3 et

Tableau I-4), généralement voisin de 10^{-11} à $10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$.

Tableau I-3 : Valeurs « expérimentales » de D_{s-m} dans des opérations de diffusion de liquides dans la matrice végétale.

Matrice solide	liquide	Conditions opératoires	$D_{s-m}(10^{-10}\text{m}^2/\text{s})$	Auteurs
Riz	Eau	T=30-50°C	0,04 - 0,9	Doulia et al., 1999
Pomme	Eau	T=30-70°C	0,9 - 28	
Banane	Sucrose	Xsr%= 47-72 à 30/50°C	1,3 - 4,3	
Pomme de terre épluchée	Acide citrique	-	4,3	

Tableau I-4 : Valeurs « expérimentales » de D_{eff} dans les opérations d'extraction à partir d'une matrice végétale.

Matrice solide	de soluté	solvant	$D_{\text{eff}} (10^{-10} \text{ m}^2/\text{s})$	Auteurs
Cassis	Composés phénoliques	Ethanol/ eau sulfurisée à T=40 °C	2,43 - 1,23	Cacace et Mazza, 2003
Résidus de vinification	antioxydants	Effet de la taille des particules	0,0013 - 0,0105	Pinelo et al., 2006
Feuilles de tabac	tanins	Eau	0,45	Simeonov et al., 1999

Ces éléments confirment, d'une certaine façon, que la diffusion du solvant dans la matrice solide doit souvent être le processus le plus lent et apparaît alors comme étant le « principal » processus limitant l'ensemble de l'opération.

I-3.3. COMPLEXITE DU TRANSFERT, APPROCHE NON FICKIENNE ET IMPACT STRUCTUREL

Nous pouvons donc considérer, dans beaucoup de cas, le transfert du solvant au sein du produit en parallèle à d'autres phénomènes, mais, en tant que le processus le plus lent, il limite souvent le taux global de transfert. Cependant, le transfert du solvant à travers les matrices solides est plus compliqué que la simple diffusion de Fick dans un gaz ou dans un liquide. On pourrait quelquefois coupler à la diffusion à travers la matrice solide une diffusion dans le liquide interstitiel ou éventuellement une diffusion dans la phase gazeuse du solide poreux.

Roques, (1987) a signalé que la mesure des coefficients de diffusion réels (apparents) est toujours influencée par d'autres phénomènes interférents. Une grande variété de méthodes a été employée pour la détermination des coefficients de diffusion, cependant, il y a une grande difficulté en comparant les différents résultats ainsi qu'en systématisant toute l'information disponible. Gekas, 1992 a également rapporté des coefficients de diffusion pour des solutés dans une grande variété de matrices alimentaires. Il est bien connu que le coefficient de diffusion dépend d'autres facteurs tels que la température mais sa détermination nécessite une bonne identification du mécanisme diffusionnel. La dépendance du coefficient de diffusion à l'égard de la température dans des matrices végétales a d'ores et déjà été identifiée (paragraphe ii.b.2) par l'équation de Stokes-Einstein (Cusler, 1984).

Dans tous les cas, le processus, bien que complexe, est régi par un gradient de paramètre(s) comme élément moteur ; la détermination du coefficient de diffusion dépend de la valeur précise d'équilibre. De nombreuses études de transfert de masse dans le système végétal supposent que l'équilibre correspond à une égalité des concentrations dans les divers points du milieu. Or, du point de vue strictement thermodynamique, l'équilibre se traduit par une égalité des activités, soit souvent par une égalité des concentrations mais ceci n'est pas systématiquement vrai. L'évaluation des conditions d'équilibre pour différentes conditions expérimentales est salutaire aux études de diffusion.

La situation actuelle des études concernant les phénomènes de transfert de masse est dominée par la loi de Fick. Cependant, pour le transport dans les tissus végétaux, la structure des cellules et du végétal joue en général un rôle important dans les mécanismes de transfert. Les nombreuses études réalisées dans les procédés de transformations alimentaires ont montré que les changements du modèle du transfert de masse avec la température et les conditions environnementales pouvaient être intimement liées à des phénomènes au niveau cellulaire et aux mécanismes du transport dans la membrane biologique (Gekas, Oliveira et al., 2002).

Dans plusieurs situations de transformation des produits alimentaires, dans lesquelles se passent des phénomènes de convection, des effets d'agitation, et des transports passif et actif de membrane, un comportement non-Fickien est présent.

Comme proposé par (Gekas, Oliveira et al. 2002), l'élucidation du transfert de masse exige la connaissance des aspects structuraux et du moteur du processus. En outre, si un modèle non-Fickien est prévu pour être appliqué, il faut considérer, parmi les aspects de structure, le fonctionnement de la paroi cellulaire qui joue le rôle d'une membrane

d'ultrafiltration, permettant à l'eau, à des sucres et à des sels de passer librement, alors qu'elle s'oppose au passage des macromolécules (excepté dans le cas du mode symplastique du transfert direct des macromolécules, de cellule-à-cellule, par le plasmodesme).

Les matrices végétales sont complexes, multi composées, et fréquemment anisotrope. Le transfert de masse de solutés peut être influencé par le volume propre qu'occupe cette solution dans les pores du tissu globalement traduit par la porosité, et dépend du chemin diffusionnel connu sous le nom de tortuosité. Le transfert de masse doit également se produire à travers les barrières physiologiques telles que des murs cellulaires et en particulier les membranes cellulaires et dans ce cas-ci ces barrières présentent la résistance dominante.

D'autres barrières importantes pourraient être le cytoplasme entouré par les lamelles moyennes et la vacuole entourée par le tonoplaste. Les différentes membranes constituent la phase solide ou les interfaces, contenant une phase liquide (vacuole) ou une phase gazeuse (les espaces intercellulaires). Dans de nombreuses opérations d'extraction, les conditions sont implicitement choisies de façon à dénaturer les membranes cellulaires, en vue de réduire leur résistance au transfert de masse. Ceci peut habituellement être obtenu à travers un traitement à haute température (Varzakas, Leach et al. 2005) induisant une dégradation thermique, une congélation induisant des ruptures structurelles, des réactions enzymatiques, etc. Ces « prétraitements » visent une amélioration du transfert de masse (Oliveira and Silva 1992).

I-3.4. SYNTHÈSE DE LA MODELISATION

La quantité de soluté présente initialement dans la matrice solide, désignée par m_m , se trouve en partie disponible à la surface m_0 ; la part se trouvant dans le volume doit être $(m_m - m_0)$ dont une certaine quantité m_r est peut être « inaccessible » principalement en raison de sa localisation (au sein des cellules, etc.).

Dans les conditions opératoires classiques d'extraction par solvant (choix d'un bon solvant, agitation du milieu extérieur..), en plus de la diffusion multiple et complexe (sollicitant le soluté du volume), l'opération doit également avoir lieu par convection (sollicitant le soluté présent en surface).

En termes de teneurs, on peut considérer

- ✚ X_0 qui correspond à la quantité de soluté m_0 se trouvant initialement disponible à la surface ; elle sera éliminée d'une façon très rapide par convection ;
- ✚ $(X_m - X_0)$ qui correspond à la quantité de soluté $(m_m - m_0)$ se trouvant initialement (d'une façon supposée uniforme et homogène) en volume. Elle évolue au cours du temps puisqu'elle est sollicitée par diffusion. Au temps t , elle est signalée par X .
- ✚ X_r qui correspond à la quantité de soluté m_r inaccessible dans les conditions de l'opération.

I-3.4.a. DEUXIÈME LOI DE FICK

Dans les conditions citées plus haut, et dans la limite de validité de l'hypothèse de la diffusion du solvant comme processus limitant, la relation exprimée par un modèle inspiré de la deuxième loi de Fick peut s'écrire sous la forme :

Équation I-15/

$$\frac{\partial X}{\partial t} = -D_{eff} \nabla^2 X$$

Où.

X : la teneur en soluté du solide (mg/g MS).

I-3.4.b. IMPACT DE LA TEMPERATURE ET DE LA STRUCTURE DANS LA MODELISATION DU PROCEDE D'EXTRACTION

L'Équation I-15 ne peut être valable que dans la limite d'un coefficient D_{eff} constant dans toute la structure solide, ce qui implique la nécessité d'adopter l'hypothèse d'une parfaite homogénéité de la matrice solide aux deux plans structurel et thermique.

I-3.4.b.i. Impact de la structure dans la modélisation du procédé d'extraction

Au plan structurel, qu'elles soient des feuilles, tiges, bois, racines ou fleurs, chaque partie des plantes peut souvent être considérée avec une structure à la fois anisotrope et homogène impliquant ainsi une situation macroscopique identique en termes de diffusivité en tout point de la matrice solide.

i.a. Quantification de l'effet structurel

(Aguilera 2002) a proposé une forme simple pour évaluer l'effet de la structure sur le transfert de masse pour comparer le coefficient de diffusion effective D_{eff} à la diffusivité D_{AB} d'une molécule A se déplaçant à travers un milieu B homogène et à dilution infinie déterminée à partir des données expérimentales. Une première approximation est celle appliquée aux solides poreux pour lesquels la D_{AB} est corrigée par le rapport de la porosité à la tortuosité. Partant de ce concept, (Aguilera 2002) a calculé le rapport de D_{eff} à D_{AB} pour des flocons de soja extraits par solvant en considérant la structure du produit en tant qu'un composite de murs imperméables arrangés perpendiculairement à l'écoulement et uniformément distribués selon une matrice continue et perméable, contenant l'huile.

Le modèle proposé (Eq.II-14) dépend de la fraction de volume des murs (ϕ) et leur géométrie (α =longueur/épaisseur). Ce modèle permet d'établir la variation de D_{eff}/D_{AB} de 0 (quand la fraction de volume des murs imperméables et la géométrie sont élevées) à proche de 1 (quand les murs sont en grande partie absents).

Équation I-16/

$$\frac{D_{eff}}{D_{AB}} = \frac{1}{1 + \alpha^2 \phi^2} \times (1 - \phi)$$

La considération précédente montre que dans la plupart des cas où la diffusion est le mécanisme principal du transfert de masse, l'architecture et les propriétés des éléments intervenants peuvent expliquer l'importance pratique de D_{eff} , dans l'analyse et la conception des processus contrôlés par le mécanisme de diffusion (Welti-Chanes, Vergara-Balderas et al. 2005).

(Crossley and Aguilera 2001) ont étudié plusieurs cas d'extraction de composés alimentaires en appliquant la théorie de diffusion et la loi de Fick à différentes architectures microstructurales. Un algorithme mathématique a été développé et programmé par MATLAB pour un système hétérogène bidimensionnel. Les architectures examinées inclut : (1) une structure avec des pores droits, (2) des flocons avec des plaquettes imperméables, (3) une matrice avec des particules dispersées imperméables et du (4) matériel cellulaire. Les résultats ont montré que la structure de la phase solide

a un impact plus marqué que les autres paramètres utilisés habituellement pour corriger l'effet de la structure (tortuosité, porosité, fraction volumique...).

BENAMOR et ALLAF proposent alors une expansion de la matrice solide par un traitement de DIC, comme élément d'une première intensification des opérations d'extraction par solvant à travers l'amélioration de l'aptitude de la matière à subir le passage et la diffusion des solvants.

***i.b.* L'expansion**

La structure propre de la matière végétale et l'utilisation de matériaux (partiellement) séchés impliquent une certaine présence d'un degré d'expansion par comparaison avec la matière proprement dite (produit parfaitement compact). La caractérisation du produit à étudier en termes d'expansion est essentielle dans de nombreux cas que nous avons à étudier. Cette expansion se traduit par une modification de la masse volumique. MOHAMED-MOUNIR et ALLAF ont ainsi proposé de définir le **taux d'expansion absolu ϵ_a** comme étant :

Équation I-17 :
$$\epsilon_a = \rho_r / \rho$$

Où.

ρ_r est la masse volumique intrinsèque de la matière sèche proprement dite, obtenue généralement par pycnomètre à gaz,

ρ est la masse volumique apparente des morceaux, granules du produit considéré,

En vue d'exprimer l'expansion que subit (souvent par texturation) la matière végétale, MOHAMED-MOUNIR et ALLAF ont également proposé de définir le **taux d'expansion relative ϵ_r** comme étant :

Équation I-18 :
$$\epsilon_r = \epsilon_a / \epsilon_{ao} = \rho_o / \rho_e$$

Où.

ϵ_{ao} est le taux d'expansion absolu de la matière sèche initiale,

ϵ_a est le taux d'expansion absolu de la matière sèche à la suite de sa texturation.

ρ_o est la masse volumique de la matière sèche initiale,

ρ_e est la masse volumique de la matière sèche à la suite de sa texturation.

I-3.4.b.ii. Impact de la température dans la modélisation du procédé d'extraction

Le comportement de la diffusion du solvant vis-à-vis de la température est un point critique. En effet, les divers auteurs s'accordent sur une expression de la diffusivité D_{eff} de la forme :

Équation I-19 :
$$D_{eff} = A \cdot \exp(-E/RT).$$

De nombreuses études et analyses expérimentales de l'extraction nécessiteraient la détermination de la valeur de la diffusivité D_{eff} . Pourtant, très peu de travaux traitent de la détermination de la diffusivité D_{eff} et encore moins de son évolution en fonction de la température. Citons à titre d'exemple le cas de l'eau dans le riz Paddy pour lequel Bakker-Arkema *et al.* (1983) dressent le Tableau I-5 des caractéristiques obtenues à partir du séchage en couche mince, à des températures allant de 35°C à 55°C et une teneur initiale en humidité égale à 30% base sèche (g d'eau / 100 g de matière sèche) selon une modélisation de type Fickéenne :

Tableau I-5 : Valeurs des coefficients A et E dans l'expression $D_{eff} = A \cdot \exp(-E/RT)$; cas d'un riz court (Bakker-Arkema *et al.*, 1983).

	A ($10^{-4} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$)	E (kJ/mol)	B (K)	D_{eff} de l'eau à 35°C ($10^{-12} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$)	D_{eff} de l'eau à 45°C ($10^{-12} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$)	D_{eff} de l'eau à 55°C ($10^{-12} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$)
Balle	4,10*	48,58	5842,8	2,37084	4,30505	7,53802
Son	9,12	50,00	6013,5	3,02466	5,58885	9,94738
Endosperme	3,3	43,28	5206,1	1,50546	2,56161	4,21969

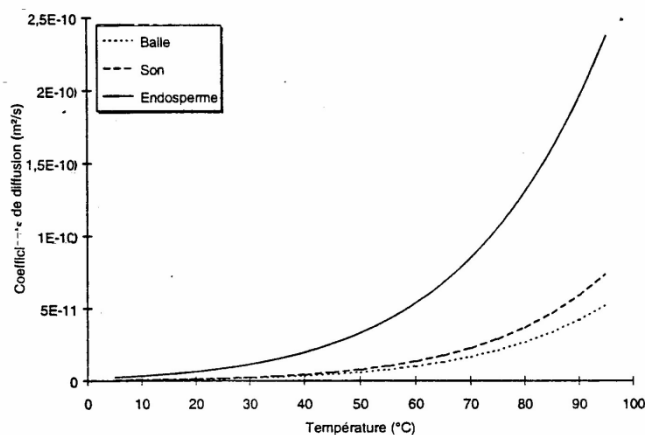


Figure I-5 : Evolution des coefficients de diffusion de l'eau dans la balle, le son et l'endosperme en fonction de La température (du Peuty-charbonnier, 1995).

Ce transfert de masse doit généralement être comparé à celui de la chaleur. D'autres travaux sont également effectués en ce sens. Ainsi, dans le cas des différentes parties du riz paddy (balle, son et Endosperme), Lu et Siebenmorgen, 1992, et Sokhansanj et Gustafson, 1989) ont dressé le tableau suivant :

Tableau I-6 : Valeurs de quelques caractéristiques de la balle, du son et de l'endosperme du paddy (Lu et Siebenmorgen, 1992, et Sokhansanj et Gustafson, 1989).

	Diffusivité ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$)	Conductivité ($\text{W}.\text{m}^{-1}.\text{K}^{-1}$)	Masse volumique ($\text{kg}.\text{m}^{-3}$)	Diffusivité thermique ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$)
balle	$4,07 \cdot 10^{-4} \cdot \exp(-48,58.103/RT)$		562	
Son	$9,12 \cdot 10^{-4} \cdot \exp(-50,00.103/RT)$	0,1	1 736	$4,80 \cdot 10^{-8}$
Endosperme	$3,29 \cdot 10^{-4} \cdot \exp(-43,28.103/RT)$	0,105	1 420	$6,16 \cdot 10^{-8}$

L'ordre de grandeur des diffusivités thermique et de matière a donc permis à de nombreux auteurs de pouvoir « rapidement » négliger tout gradient de température au sein de la matrice solide du fait d'une cinétique nettement plus importante que celle du transfert de la matière. Le trempage des « morceaux » de plantes dans un bain de solvant doit être étudié à des températures constantes allant de l'ambiante à 120 °C.

ii.a. Caractérisation thermique

La caractérisation thermique de divers types des plantes et de leurs diverses parties est nécessaire pour mener à bien les études permettant de déterminer les principales tendances des processus d'extraction par solvant. .

ii.a.1. Chaleur massique

A défaut de trouver de façon distincte la chaleur massique de chacune des plantes et de ses diverses parties, nous pourrions souvent adopter une valeur approximative commune donnée par la littérature en ce qui concerne la matière sèche proprement dite :

Équation I-20
$$C_{ps} = 1,2 \text{ kJ}.\text{kg}^{-1}.\text{K}^{-1}$$

La présence d'eau pourrait être prise en considération dans la détermination de la chaleur massique de la matière, selon une approche approximative :

$$\text{Équation I-21 } C_p = (C_{ps} + W \cdot C_{pW}) / (1 + W) = [(1,2 + 4,18 \cdot W) / (1 + W)] \text{ kJ.kg}^{-1}.\text{K}^{-1}$$

Ainsi, pour nos différents produits et pour les différents niveaux de teneur en eau, on a :

Produit	W (%)	Cp (kJ. kg ⁻¹ .K ⁻¹)
Calices de Roselle	13	1,54
Graines de <i>Tephrosia purpurea</i> non réhumidifiées	10	1,47
Graines de <i>Tephrosia purpurea</i> réhumidifiées	22	1,74

ii.a.2. Conductivité thermique

La valeur de la conductivité thermique d'un produit parfaitement isotrope dépend étroitement du taux d'expansion ϵ_e . En considérant nulle la conductivité thermique de l'air, la conductivité du produit peut être estimée à partir d'une approche « parallèle » :

$$\text{Équation I-22 : } \lambda_e = \lambda_r \cdot \rho / \rho_r$$

Où.

λ_r : est la conductivité thermique de la matière sèche proprement dite,

λ_e : est la conductivité thermique du produit expansé.

ii.a.3. Diffusivité thermique

La diffusivité thermique d'un produit est définie par :

$$\text{Équation I-23 : } \alpha = \lambda / (\rho \cdot c_p).$$

On obtient pour nos produits des valeurs de α (10^{-7} m²/s) nettement plus importantes que celles de la diffusivité D_{eff} . (10^{-10} m²/s)

Produit	ρ (kg/m ³)	Cp (kJ.kg ⁻¹ .K ⁻¹)	λ (W.m ⁻¹ .K ⁻¹)	α (m ² .s ⁻¹)
Calices de Roselle	1250	1,54	0,2	1,039E-07
Graines de <i>Tephrosia purpurea</i> non réhumidifiées	1360	1,47	0,2	1,000E-07
Graines de <i>Tephrosia purpurea</i> réhumidifiées	1360	1,74	0,2	8,452E-08

Tableau I-7 : L'identification thermique des divers produits utilisés.

	Roselle	<i>Tephrosia purpurea</i>
h (mm) :	0,27	
L (mm) :	20	
l (mm) :	8	
R (mm) :		0,15
dp (mm)	0,27	0,15
ρ_a (kg.m ⁻³) masse volumique du produit	1250	1360
c_p Chaleur massique en J.kg ⁻¹ .K ⁻¹	1215	2636
λ_r (W.m ⁻¹ .K ⁻¹)	0,105	0,105
α_r (diffusivité thermique m ² .s ⁻¹)	1,039E-07	1,00E-07
Ordre de grandeur de D_{eff} Diffusivité du solvant dans la matière (Ordre de grandeur en m ² .s ⁻¹) à vérifier plus loin	1E-10	1,0000E+10

I-3.4.c. SOLUTIONS DE LA DEUXIEME LOI DE FICK

I-3.4.c.i. Solution de Crank

Différentes solutions de la deuxième loi de Fick peuvent être obtenues en fonction des conditions initiales et aux limites. Des solutions mathématiques sont proposées : des séries ou des fonctions d'erreur pour de faibles temps de diffusion, ou des séries trigonométriques ou des fonctions de Bessel pour de plus grands temps (Crank 1975). En cherchant à trouver une solution de l'ensemble des processus d'extraction (en tant que phase liquide continue) au sein de la matrice solide, nous adoptons la solution de l'équation de diffusion proposée par Crank en fonction de la géométrie de la matrice solide (1975) :

Équation I-24
$$\frac{X_m - X_o - X}{X_m - X_o - X_r} = 1 - \sum A_i \exp(-q_i^2 \tau)$$

Ou encore :

Équation I-25
$$\frac{X - X_r}{X_m - X_o - X_r} = \sum A_i \exp(-q_i^2 \tau)$$

Avec :

X : teneur de soluté à l'instant t dans le solide (mg/g MS);

X_m : teneur de soluté moyenne initiale ($t=0$) dans le solide (mg/g MS) ;

X_r : teneur de soluté dans le solide inaccessible ; elle correspond à la valeur de X à l'équilibre final ($t \rightarrow \infty$) (mg/g MS) ;

X_o : teneur initiale de soluté correspondant à la quantité présente à la surface et extraite par convection (mg/g MS);

D_{eff} : diffusivité effective (m^2/s)

τ : nombre de Fick= $D_{eff} \cdot t / d_p^2$

d_p : longueur caractéristique dépendant de la forme du produit (rayon dans le cas de sphère ou de cylindre infini ou la moitié de l'épaisseur dans le cas d'une plaque)

A_i et q_i : coefficients qui dépendent de la géométrie du solide

Tableau I-8 : Détermination des coefficients A_i et q_i pour différentes géométries de solide dans le cas d'un nombre de Biot infini et d'une extraction en batch (Schwartzberg and Chao 1982)

géométrie	n=liquide/solide	A_i	q_i
Plaque infinie	fini	$\frac{2n(n+1)}{(n+1) + (nq_i)^2}$	$-\frac{\tan q_i}{n}$
	infini	$\frac{8}{(2i-1)^2 \pi^2}$	$\frac{(2i-1)\pi}{2}$
Sphère	fini	$\frac{6n(n+1)}{9(n+1) + (nq_i)^2}$	$\frac{(3 + nq_i^2) \tan(q_i)}{3}$
	infini	$\frac{6}{(i\pi)^2}$	in

Cylindre infini	fini	$\frac{4n(n+1)}{4(n+1) + (nq_i)^2}$	$-\frac{2J_1(q_i)}{nJ_0(q_i)}$
	infini	$\frac{4}{q_i}$	$J_0(q_i)=0$

Notons que de nombreux auteurs considèrent la teneur X_r généralement égale à zéro. Cette hypothèse ne peut être adoptée dans notre étude du fait de la modification du degré de « disponibilité » (d'accessibilité) du soluté dans la matière en fonction des conditions opératoires DIC et du degré de texturation qui en découle. Nous nous sommes donc accorder la valeur $X_r=0$ au seul point à maximum d'extraction.

Ainsi, en développant ces deux expressions, on obtient dans le cas:

✚ Une plaque infinie :

Équation I-26

$$\frac{X - X_r}{X_m - X_o - X_r} = \frac{8}{\pi^2} \exp^{-\frac{\pi^2 D_{eff} t}{4dp^2}} + \frac{8}{9\pi^2} \exp^{-\frac{9\pi^2 D_{eff} t}{4dp^2}} + \frac{8}{25\pi^2} \exp^{-\frac{25\pi^2 D_{eff} t}{4dp^2}} + \frac{8}{49\pi^2} \exp^{-\frac{49\pi^2 D_{eff} t}{4dp^2}} + \dots$$

✚ Une sphère :

Équation I-27 :

$$\frac{X - X_r}{X_m - X_o - X_r} = \frac{6}{\pi^2} \exp^{-\frac{\pi^2 D_{eff} t}{dp^2}} + \frac{6}{4\pi^2} \exp^{-\frac{4\pi^2 D_{eff} t}{dp^2}} + \frac{6}{9\pi^2} \exp^{-\frac{9\pi^2 D_{eff} t}{dp^2}} + \frac{6}{16\pi^2} \exp^{-\frac{16\pi^2 D_{eff} t}{dp^2}} + \dots$$

Ces expressions sont souvent utilisées pour le calcul de D_{eff} . Le choix du nombre de termes de la série à utiliser dépend des ordres de grandeur du temps, de la diffusivité et de la longueur caractéristique, ainsi que du degré de précision visé. En effet, des outils de calculs, tel que Matlab, permettent de résoudre cette équation en allant jusqu'à des valeurs très importantes ($i > 1000$), sans se soucier nécessairement de la pertinence d'un tel développement. Toutefois, et tout particulièrement quand les moyens de calcul mathématique l'imposent, il est important d'identifier l'indice i de la série, à partir duquel on peut supposer négligeables les termes de la série qui suivent. Une certaine itération est quelquefois nécessaire.

Pour un temps d'extraction suffisamment long, l'Équation I-24 peut se réduire au premier terme (Schwartzberg and Chao 1982).

La difficulté supplémentaire qui s'ajoute à notre modélisation est le fait que X_r est différent pour la matière non traitée par DIC et entre la matière différemment traitée par DIC.

La diffusion de caféine à partir des grains de café a été étudiée en employant la solution analytique de la deuxième loi de Fick en supposant les grains sphériques et la concentration à la limite constante (Hulbert, Biswal et al. 1998) ; (Spiro and Selwood 1984); (Udaya-Sankar, Raghavan et al. 1983). La décaféination du café est un processus d'extraction solide-liquide, dans lequel la caféine est transférée à partir de la matrice de grains de café dans le solvant. Les graines de café ne sont pas sphériques et la concentration en caféine dépend du temps. C'est-à-dire, il n'y a pas des états constants aux limites. Par conséquent, (Espinoza-Pérez, Vargas et al. 2007) ont proposé une description mathématique de la décaféination en se basant sur le transfert de masse dans les deux phases. Les différentes valeurs des coefficients de diffusion de la caféine sont résumées dans le Tableau I-9.

Tableau I-9 : Valeur de la diffusivité dans l'extraction de la caféine en fonction du solvant et de la température

Auteur	Valeur ($10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$)	Température	Solvant
Bichel, 1979	1.35	50 °C	CHCl ₃
Bichel, 1979	0,72	37 °C	CH ₂ Cl ₂
Spiro and Selwood, 1984	1.730	84 °C	Eau
Udaya-Sankar et al., 1983	0,8100	non défini	CH ₂ Cl ₂
Hulbert et al., 1998	0,95	30 °C	CH ₂ Cl ₂
Espinoza-Perez et al., 2007	3.209	90 °C	Eau

CHAPITRE I-4.

LA STRUCTURE VEGETALE

I-4.1. LA CELLULE VEGETALE ET SES CONSTITUANTS

La cellule végétale est l'élément unitaire de toutes les plantes. Les principales caractéristiques qui la différencient d'une cellule animale sont :

- + La présence d'un cadre rigide qui est la paroi cellulosique.
- + La présence de chloroplastes.

La Figure I-6 présente le schéma de l'organisation d'une cellule végétale.

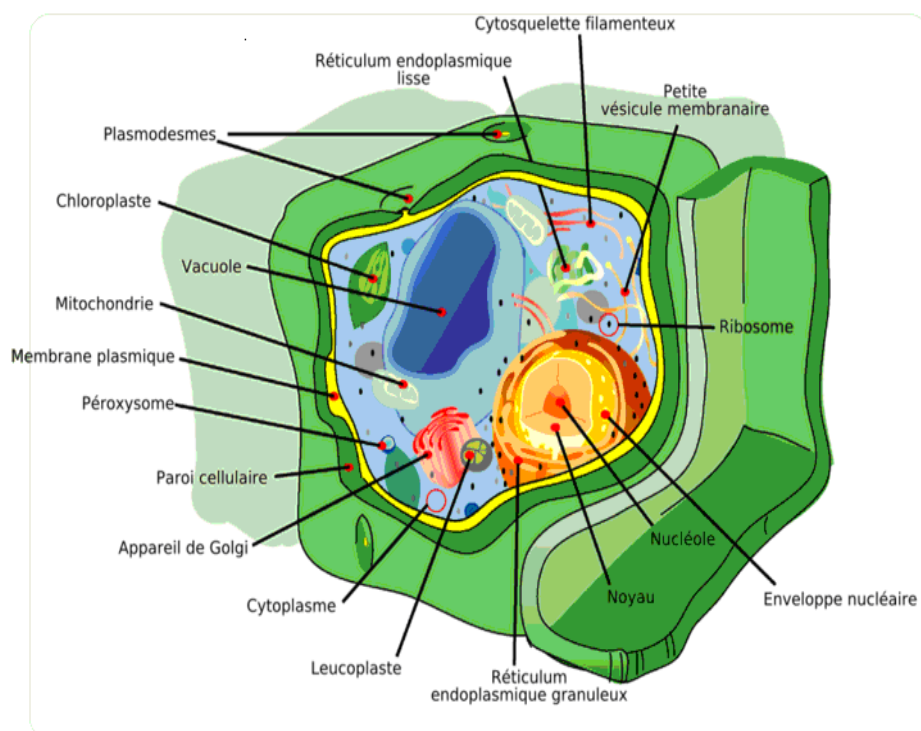


Figure I-6: Structure typique d'une cellule végétale. (Wikipedia).

I-4.1.a. LA PAROI CELLULAIRE

La paroi est l'enveloppe la plus externe de la cellule végétale. Elle est essentiellement composée de polymères glucidiques, cellulose et pectine, de protéines pariétales et éventuellement d'autres composés de nature phénolique (lignine et subérine). La paroi est composée de trois parties :

1. **Paroi primaire**, de nature pecto-cellulosique, la paroi primaire n'existe seule que dans les cellules juvéniles. Elle est extensible, ce qui permet la croissance cellulaire (élongation),
2. **Paroi secondaire**, elle apparaît lors de la différenciation de la cellule. Elle est constituée de cellulose et d'hémicellulose et est enrichie en composés phénoliques : lignine (pour renforcer la rigidité), cutine et subérine (pour l'imperméabiliser). Cette différenciation s'observe pour les cellules conductrices de sève du xylème (le bois) et pour différents tissus de soutien (sclérenchyme) ou de protection (liège).

3. **Lamelle moyenne**, c'est la partie la plus externe de la paroi et elle est commune à deux cellules contiguës. C'est elle qui se forme la première et elle est constituée de matières pectiques. Elle aide à l'adhésion de l'ensemble des cellules végétales.

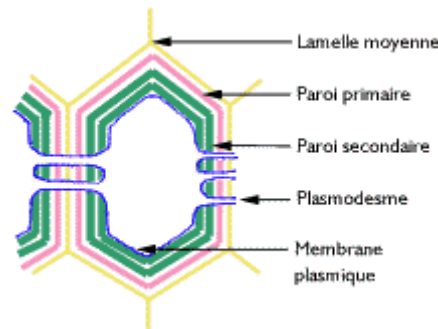


Figure I-7 : Structure de la paroi cellulaire

I-4.1.b. LA MEMBRANE CELLULAIRE

I-4.1.b.i. Structure de la membrane - Les phospholipides

La membrane est semi perméable, elle ne se laisse traverser que par de l'eau et quelques solutés et espèces ioniques de petite taille et empêche le libre passage des macromolécules. Elle joue à la fois le rôle d'un filtre et d'un moyen de transport de soluté (Aguillera and Stanley 1999). Les membranes sont composées principalement de phospholipides et de protéines. Les phospholipides sont formés d'une partie hydrophobe (les 2 chaînes d'acides gras) et une partie hydrophile (le groupement phosphate qui peut aussi porter un groupement). Les protéines sont essentiellement de deux classes:

1. Les protéines traversant de part en part la membrane plasmique : les protéines intrinsèques ou intégrales. Elles jouent un rôle dans la réception/transmission de signaux à travers la membrane, le modelage et la fusion des membranes mais essentiellement en tant que transporteurs membranaires qui gèrent le passage de métabolites. Elles sont sélectives et sont contrôlées de façon très fine. Il existe deux types de transporteurs :
 - a) Les protéines canaux assurent un transport passif de molécules à travers la membrane. Le passage des molécules à travers un canal suit les lois de la diffusion. Cependant elles peuvent être plus ou moins sélectives. Elles peuvent aussi se fermer et s'ouvrir en fonctions de différents stimuli (électrique, chimique, mécanique.). Elles jouent un rôle important dans la définition du potentiel de membrane, la sensibilité de certaines cellules à certains signaux extérieurs.
 - b) Les protéines pompes : elles se différencient des canaux par le fait que ce n'est plus le gradient électrochimique des molécules qui assure le mouvement ionique mais le couplage du transport à une réaction enzymatique exergonique, comme l'hydrolyse de l'ATP. Le mouvement de la molécule devient donc unidirectionnel et peut même se produire contre le gradient électrochimique. La molécule se concentre donc ou au contraire est totalement éliminée de la cellule. Le transport est ici actif et non plus passif comme pour les canaux.
2. Les protéines ne traversant pas, accolées à la membrane plasmique : les protéines périphériques (associées soit à la bicouche lipidique soit à une protéine intrinsèque), elles sont situées dans le cytoplasme ;

I-4.1.c. LA VACUOLE

La vacuole constitue l'essentiel du volume cellulaire, soit 80 et parfois même 90% de la cellule. Les vacuoles sont entourées d'une membrane appelée membrane vacuolaire ou tonoplaste. La vacuole renferme une multitude d'ions inorganiques, d'acides organiques, de glucides, d'enzymes ainsi que de métabolites secondaires dont les pigments. A ce titre, la vacuole joue un rôle majeur dans la régulation des grandes fonctions physiologiques de la cellule végétale (pH, pression osmotique, concentrations ioniques,.). La forte teneur en solutés de la vacuole permet d'absorber l'eau qui est nécessaire à l'accroissement cellulaire. Les cellules jeunes qui présentent une intense activité de division possèdent de nombreuses petites vacuoles. Lors de la maturation de ces cellules, ces petites vacuoles fusionnent formant une vacuole unique qui s'agrandit et qui caractérise la cellule différenciée (Hopkins 2003).

I-4.1.c.i. Les glucides

Le saccharose, ou sucrose pour les anglo-saxons, est la forme de transport qui permet les mouvements entre les différentes zones de synthèse, d'utilisation et de mise en réserve. Forme de réserve temporaire issu de la photosynthèse, il constitue des réserves durables chez quelques espèces particulières : canne à sucre, betterave, érable à sucre... outre le saccharose, plusieurs glucides peuvent être stockés dans la vacuole. Construit à partir du saccharose, ils ne sont pas réducteurs. La plupart sont des oligosides très soluble et les polyosides, comme les fructosanes faiblement polymérisés, forment des solutions pseudo colloïdales.

Les oligosides résultent de l'addition d'un ou de plusieurs oses à la molécule de saccharose. Excepté le raffinose, les oligosides dérivés du saccharose ne se trouvent qu'en faible quantité ; ils regroupent des formes de réserve spécifiques d'espèces ou de petits groupes végétaux. Citons le gentianose, constituant la racine de gentiane, le mélézitose, produit d'exsudation de certains végétaux à la suite de piqûres d'insectes, le stachyose présent dans des racines du crosne de Japon, etc. (Guignard 2000).

I-4.1.c.ii. Les métabolites secondaires

La distinction entre métabolites primaires et secondaires n'est pas toujours facile. Du point de vue de leur biosynthèse, métabolites primaires et secondaires ont en commun certains intermédiaires et dérivent des mêmes voies métaboliques. Les métabolites secondaires ne font pas *sensu stricto*, partie des matériaux de base de la cellule (Hopkins 2003).

Les plantes produisent une grande diversité de métabolites secondaires pour la défense et la survie dans l'écosystème. Les métabolites secondaires végétaux, dépassant actuellement 100 000 substances identifiées, appartiennent à trois classes principales de chimiques : les terpènes (un groupe de lipides), les phénoliques (dérivés de glucides) et les alcaloïdes (dérivés d'acides aminées) (Cooper 1999; Hopkins 2003).

Les métabolites secondaires sont recherchés parce qu'ils sont reconnus pour leurs activités biologiques nombreuses qui peuvent promouvoir des effets positifs de santé, en termes d'activités antibactériennes, anticancéreuses, antifongiques et antioxydantes (Figure I-8) utilisées dans les secteurs industriels de l'agriculture, de l'alimentation et des pharmaceutiques.

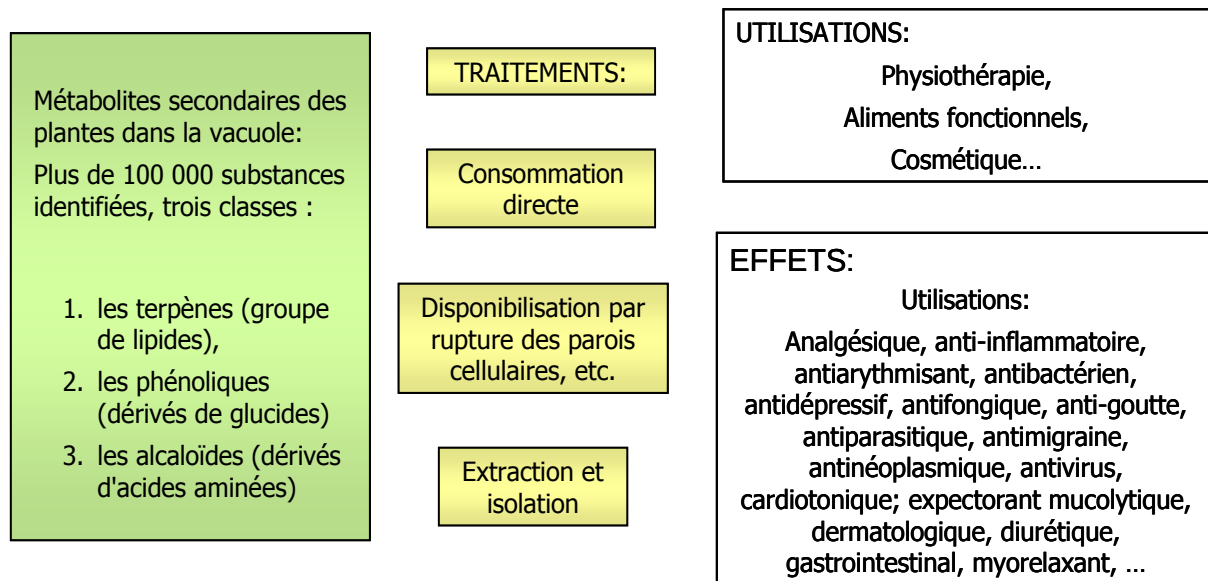


Figure I-8 : Différentes utilisations des métabolites secondaires

CHAPITRE I-5.

MOLÉCULES ACTIVES

Les végétaux produisent une grande variété de métabolites secondaires, et en particulier des composés phénoliques ou des oligosaccharides, dont l'intérêt est souvent important pour l'homme dans les domaines cosmétique, pharmacologique et agroalimentaire. On abordera dans cette partie le cas d'anthocyanes extraits à partir de calices d'*Hibiscus sabdariffa* et d'oligosaccharides extraits à partir des graines de *Tephrosia purpurea*.

I-5.1. LES ANTHOCYANES DES CALICES D'*HIBISCUS SABDARIFFA* OU ROSELLE

I-5.1.a. PRESENTATION DE LA PLANTE

Hibiscus sabdariffa, appelé également Roselle, Jamaïca ou Karkadé, est une plante herbacée buissonnante annuelle ou bisannuelle à port de sous arbrisseau, atteignant de 1 à plus de cinq mètres selon la variété et le mode de culture. On distingue trois phénotypes pigmentaires : jaune-vert, rouge-vert et rose. La pigmentation étant le plus souvent homogène pour tous les organes d'un même individu, (El Afry, Prinz et al. 1979)) ont étudié les caractéristiques physiques des plantes originaires de différents pays (Thaïlande, Amérique centrale, Sénégal, Inde et Egypte). De grandes différences morphologiques sont mises en évidence : hauteur du plant (146 à 239 cm) ; forme de feuilles (3 à 5 lobes) ; couleur de pétales (jaune, orange ou rouge) et forme et couleurs des calices variées.

La fleur est axillaire, solitaire au sommet d'un pédoncule court presque cessible. Le calice est presque glabre, formé de cinq sépales auxquelles se soude un calicule extérieur multifide (8 à 12 bractéoles courtes de formes triangulaires). Les calices et calicules des fleurs sont extérieurement plus au moins rouge foncé et intérieurement peuvent montrer un dégradé du rouge au vert. Cette pigmentation rouge s'accroît au cours du développement et semble d'autant plus marqué que l'insolation est intense (Paul 1995).

Le fruit est une capsule ovoïde à cinq loges composée chacune de trois lames minces, lisses en dedans et hérissées en dehors de poils fins et piquants. Chaque fruit renferme une vingtaine de graines noires à albumen huileux (Paul 1995).

I-5.1.a.i. Composition chimique

L'analyse de la composition chimique des différentes parties de la plante ne présente que peu d'intérêt, puisque la majeure partie de ces composés étant concentrée dans le calice.

Les calices frais contiennent divers éléments chimiques tels que des glucides, de la cellulose, des vitamines, de la thiamine, de la riboflavine ou encore de la niacine. De plus le karkadé est riche en fer, phosphore et calcium.

La teneur en certains éléments du calice sec varie en fonction de la variété, le pays d'origine, le mode de culture comme on peut le constater sur le tableau III-10.

Tableau I-10: composition des calices de karkadé

	Calice frais a (%)	Calice sec a (%)	Calice sec b (%)
Eau	86.3	18.2	15.8
Protides	1.6	8.3	3.4
Lipides	0.1	0.35	10.1

Glucides	11.1	64.2	63.5
Cellulose	2.5	15.8	11.04
Cendres	0.9	8.9	11.9
Calcium	1620 ppm	11400 ppm	-
phosphore	600	1950	-
Fer	38	310	-
thiamine	0.4	0.3	-
Riboflavine	0.6	1.6	-
Nicotinamide (vit pp)	5	30	-
Vitamine A	1.42	0.63	-

a: (Reaubourg and Monceaux 1942)

b:(Tourey, Giogi et al. 1967)

Les composés chimiques les plus importants, dans l'extrait de l'*Hibiscus sabdariffa* sont :

- ✓ Les acides organiques responsables de la saveur acidulés.
- ✓ Les pigments responsables de la coloration rouge foncée.

i.a. Les acides organiques

Les acides organiques sont présents dans toutes les parties de la plante : racine, tiges, feuilles, fruits. Mais c'est incontestablement dans le calice que s'accumulent ces acides, après la floraison. La Roselle serait ainsi la seule plante dont le calice aussi chargé en acides organiques, peut être assimilé à un fruit et peut être utilisé pour les mêmes usages (Tourey, Giogi et al. 1967).

Tous les auteurs ayant étudié cette plante sont quasi unanimes pour reconnaître que l'acide citrique est l'acide largement majoritaire.

Tableau I-11: les principaux acides du calice de la Roselle

	(Tourey, Giogi et al. 1967) %	(Franz and Franz 1988) %	(Kahafaga and Koch 1980) %
Acide citrique	10 - 17	12-20	23-30
Acide malique	2 -4	2-9	8-11
Acide tartrique	Traces	8	7-9
Acide oxalique	traces	-	-

Selon (Kahafaga and Koch 1980), les différences observées proviennent vraisemblablement d'un développement non optimal du calice au moment de sa récolte, des conditions de séchage des calices et des conditions variées de stockage. En effet, selon ces mêmes auteurs, la concentration des acides organiques augmente pendant le développement du calice jusqu'à atteindre des taux de 60 à 70% du poids sec entre le 30^{ème} et le 50^{ème} jour après la floraison puis diminue plus au moins rapidement quand le calice atteint son maximum de développement.

Des variations s'observent en fonction de l'origine géographique des calices. Les calices de Roselle égyptiens atteignent leur concentration maximale en acides organiques après 30 jours tandis que les calices originaires d'Inde, du Sénégal, de Thaïlande et d'Amérique centrale demandent respectivement 40-45, 45, 45-50 et 45-50 jours.

(Bachtez 1948) a mis en évidence, en plus des acides déjà cité, la présence d'un nouvel acide dans les calices d'*Hibiscus sabdariffa*. Cette substance, appelée acide hibiscique, fût caractérisée sous forme de lactone, mais très instable, ce composé se transforme spontanément en acide.

i.b. ***Les pigments : cas des anthocyanes***

Les fleurs renferment la quasi totalité des pigments de la plante, mais les feuilles n'en sont pas pour autant exemptes. Il d'agit principalement d'anthocyanes, qui sont les constituants les plus intéressants et secondairement des flavonoïdes.

Les anthocyanes, molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capables d'absorber la lumière visible, sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange (Harborne 1967) (Brouillard 1993). Leur présence dans les plantes est donc détectable à l'œil nu. Si la coloration des fleurs et des fruits est leur rôle le plus connu, on trouve également les anthocyanes dans les racines, tiges, feuilles et graines. En automne, les couleurs caractéristiques des feuilles des arbres sont dues aux anthocyanes et aux carotènes qui ne sont plus masqués par la chlorophylle.

i.b.1. *Répartition dans la plante*

A l'échelle tissulaire, les anthocyanes et les pigments de type flavonols sont généralement présents dans les couches cellulaires externes des organes végétaux, en particulier les épidermes des fruits et des feuilles. Certains fruits comme les fraises ou les cassis montrent cependant une accumulation des anthocyanes dans les tissus profonds. Chez le raisin rouge, on peut observer les deux types de situation selon les cépages. (Macheix, Fleuriet et al. 1990). A l'échelle cellulaire, les anthocyanes sont généralement localisées dans les vacuoles des cellules épidermiques, qui sont de véritables poches remplies d'eau (Merlin, Statoua et al. 1985).

L'accumulation des anthocyanes est influencée par des facteurs environnementaux tel que la lumière, la température, la nutrition de la plante et les attaques pathogènes ; la lumière est le facteur le plus important de tous. En général, l'accumulation des anthocyanes résultant d'une exposition prolongée à la lumière rouge est induite par les phytochromes, alors que la réponse à une lumière bleue ou aux ultraviolets est induite par les cryptochromes (des photorécepteurs d'UV-A) et ou de photorécepteurs d'UV-B.

Dans les vacuoles, les anthocyanes sont accumulées sous forme de structures sphériques pigmentées appelées anthocyanoplastes. Ces structures sont nommées incorrectement anthocyanoplastes puisque des études structurales récentes montrent qu'il s'agit d'inclusions membranaires et non de structures libres dans le cytoplasme (Cormier 1997). La self-association des anthocyanes impliqués dans la formation des anthocyanoplastes peut servir à protéger les pigments des réactions de dégradation.

L'importante production d'anthocyanes et d'anthocyanoplastes vacuolaires dans la plante est le résultat d'une concentration basse en nitrates et d'une forte concentration en sucres, ce qui suggère que l'ATPase du tonoplaste sensible aux nitrates puisse être impliquée dans la translocation et l'accumulation d'anthocyanes dans les vacuoles (Jackman and Smith 1996).

i.b.2. *Biosynthèse des anthocyanes*

La voie de biosynthèse des anthocyanes suit la voie commune des autres flavonoïdes voie désormais bien définie tant d'un point de vue biochimique que génétique (Markakis 1982). Cette biosynthèse est contrôlée par un certain nombre de gènes structuraux.

Les précurseurs de la biosynthèse des anthocyanes sont les flavan-3,4-**cis**-diol ou leucoanthocyanidines (Grisebach 1982). Cependant les mécanismes et enzymes impliqués dans cette biosynthèse ne sont à ce jour pas totalement connus. L'aglycone de l'anthocyane, qui est aussi le chromophore, est appelé anthocyanidine ou aussi cation flavylum ou 2-phényl-1-benzopyrilium (Figure I-9).

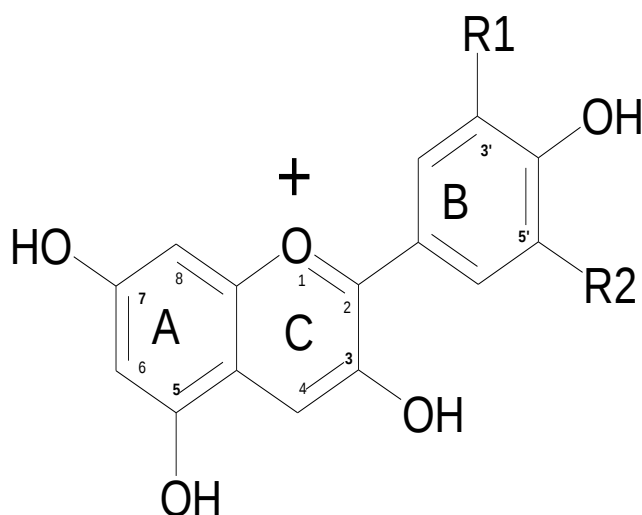


Figure I-9: structure du cation flavylium ou 2-phényl-1-benzopyrylium

En raison de la très grande réactivité du noyau flavylium avec les nucléophiles, les anthocyanidines sont relativement instables et rarement présentes sous cette forme dans les tissus végétaux. Généralement elles sont présentes sous forme d'hétérosides comme la plupart des flavonoïdes ; on parle alors d'anthocyanines. Dix huit anthocyanines différentes sont connues et dont les plus courantes sont présentées dans le Tableau I-12.

Tableau I-12: principales anthocyanidines rencontrés chez les végétaux

Anthocyanidine	R1	R2	Couleur à pH:1
Delphinidine	OH	OH	Bleu-violet
Cyanidine	OH	H	rouge
Pelargonidine	H	H	orange
Petunidine	OCH ₃	OH	bleu-pourpre
Peonidine	O CH ₃	H	rose-rouge
Malvidine	O CH ₃	O CH ₃	pourpre

En position 3' et 5' on trouve selon les cas : -H, -OH ou -CH₃. Les anthocyanes sont glycosylées le plus souvent en position 3 et 5, les sucres les plus fréquents étant des monosaccharides (glucose, galactose, rhamnose et arabinose), des di- et trisaccharides formés par combinaison des monosaccharides précédents. Dans la nature, les anthocyanes hydroxylées en position 3 sont en règle générale toujours glycosylées mis à part quelques 3-déoxyanthocyanes telles que l'apigéninidine (3-déoxypélargonidine), la lutéolinidine (3-déoxycyanidine) et la tricétinidine (3-déoxydelphinidine) (Brouillard 1982). La glycosylation et l'acylation renforcent la stabilité des anthocyanes. De même le degré de glycosylation favorise la stabilité des anthocyanes (les diosides sont plus stables que les mono osides correspondants) (Markakis 1982).

Selon le degré d'hydroxylation et de méthylation, la teinte dominante des anthocyanes varie de l'orange (Pelargonidine) au violet (Delphinidine). Par exemple si le nombre de groupements hydroxyles sur le cycle B augmente, l'absorbance maximale des anthocyanes dans le visible est déplacée vers les grandes longueurs d'onde et la couleur passe du rouge-orangé au violet et s'accompagne d'une faible stabilité du chromophore. En revanche, si on remplace les hydroxyles par des méthoxyles, le chromophore est beaucoup plus rouge et stable (Figure I-10).

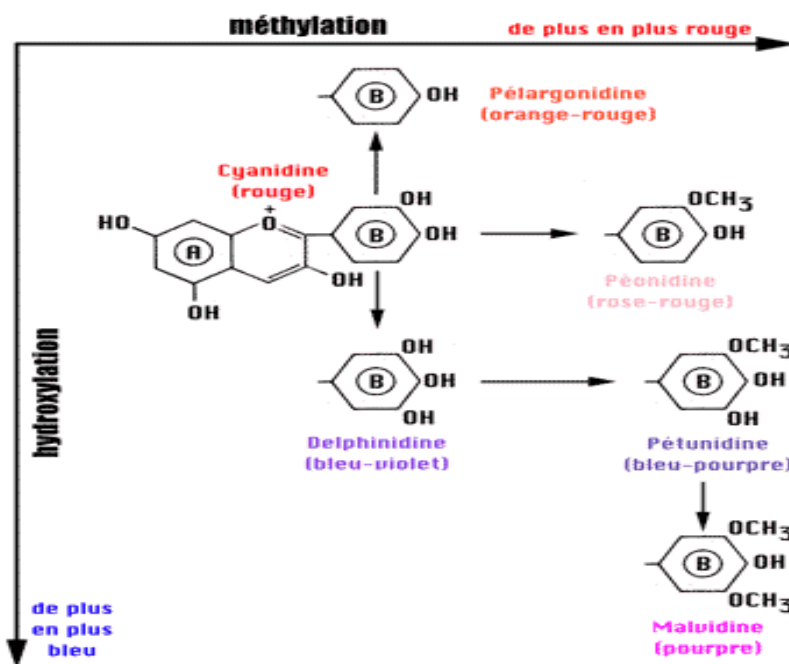


Figure I-10 : couleur des différentes anthocyanidines à pH 1

i.b.3. Propriétés des anthocyanes

i.b.3.1. Effet du pH

Les molécules d'anthocyanes, en milieux aqueux se conduisent pour la plupart d'entre elles comme de véritables indicateurs de pH. Elles sont rouges pour des valeurs de pH faibles, bleues pour des pH intermédiaires et deviennent incolores pour des valeurs élevées de pH. (Brouillard and Delaporte 1977; Clifford 2000). Ces changements de couleur sont dus à plusieurs types d'équilibre chimiques entre différentes formes structurales dépendantes du pH (Figure I-11).

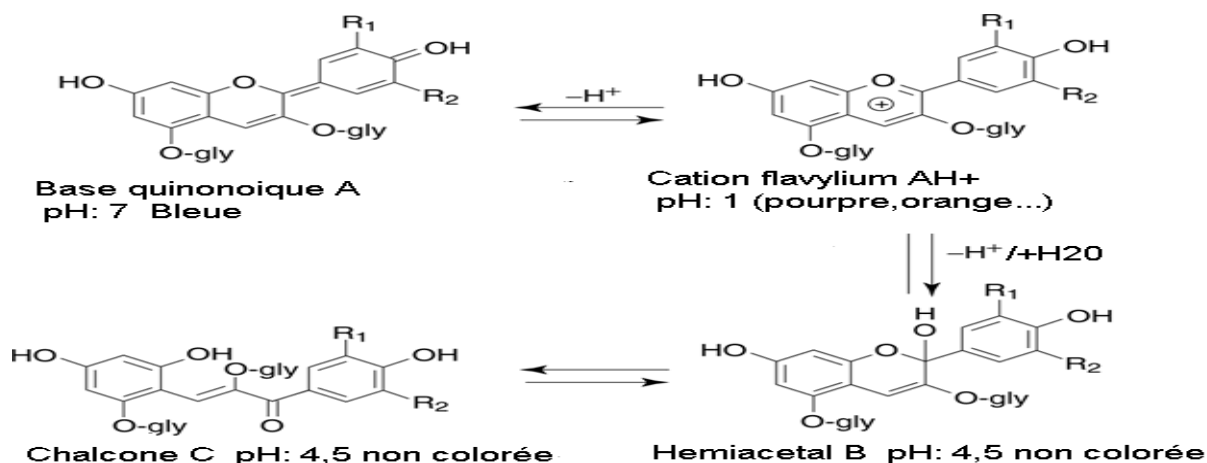


Figure I-11 : Transformations structurales des anthocyanes en solution aqueuse acide (pH 1 à 6-7).

En milieu acide fort, les anthocyanes sont stables et prédominent sous leur forme cationique AH⁺ colorée en rouge, violet, orange ou pourpre. Cette forme est caractérisée par deux bandes d'absorption spécifique pour chaque anthocyane, une dans l'ultraviolet (280-300nm) et une intense dans le domaine du visible (510-530nm).

En milieu acide faible (pH 5 à 7) le cation perd très rapidement (ordre de la milliseconde) un proton ce qui conduit à la formation d'une base quinonoïque A faiblement colorée en bleu. Les solutions d'anthocyanes en milieu légèrement acide perdent assez rapidement

leur coloration (dizaines de minutes) par hydratation de la molécule (sur la position 2 du cation). L'hydratation conduit à un hémiacétal incolore B en équilibre par tautomérie cycle – chaîne avec le chalcone C associé. Si le pH augmente, le chalcone est ionisée, la structure anthocyanique est alors détruite. Les bases A et l'hémiacétal B sont respectivement les produits cinétiques et thermodynamiques des transformations structurales du cation flavylum (Sarni-Manchado and Cheynier 2006).

i.b.3.2. Effet de la température

La température est un facteur de dégradation des pigments phénoliques. Dans le cas des anthocyanes, les hautes températures favorisent l'ouverture de l'hétérocycle et la formation de chalcones (produit incolore). La déprotonation du cation flavylum par un solvant ($AH^+ \rightarrow A \rightarrow A^-$) est exothermique. Alors que l'hydratation du cation ($AH^+ \rightarrow AOH=B$) et l'ouverture du noyau pyrylium ($AOH=B \rightarrow C_E$) sont endothermiques et associées à des changements d'entropie positifs. La dégradation de la chalcone conduit ensuite à la formation d'acide carboxylique provenant du cycle B et à des carboxyaldéhydes issu du noyau A de l'anthocyanane de départ.

La dégradation thermique des anthocyanes suit une cinétique du premier ordre. On constate que pour des températures de stockage inférieures à 40 °C, l'énergie d'activation est de 70 kJ.mol⁻¹, alors qu'elle est de 95 à 113 kJ.mol⁻¹ pour des températures supérieures à 70 °C. Les anthocyanes sont donc relativement stables à de hautes températures (60-80 °C), bien que de telles conditions favorisent la formation de produits de dégradation incolores. Il semble aussi que la transformation des anthocyanes en pigments polymères plus stables augmente avec la température et le temps de stockage, contribuant ainsi au maintien de la coloration dans le cas des vins (Timberlake and Bridle 1979). Les anthocyanes d'*Hibiscus* sont partiellement décolorées à la chaleur mais conservent exactement la même tonalité (Jackman and Smith 1996).

i.b.3.3. Effet de la lumière

La lumière exerce deux effets opposés sur les anthocyanes : in vivo au sein de la plante elle favorise leur biosynthèse alors qu'en vitro dans les extraits ou les produits, elle accélère leur dégradation (Jackman and Smith 1996). Généralement instables quand elles sont exposées aux rayonnements UV ou visible ainsi qu'à d'autres radiations ionisantes, leur photo oxydation donne les mêmes produits de dégradation que ceux obtenus par chauffage. Les formes acylées semblent être moins photosensibles que les formes non acylées.

Des brevets ont été déposés traitant la limitation de la dégradation des anthocyanes dans les boissons sucrées induite par la lumière, par l'addition d'acide gallique, de dimères d'acide gallique, d'acide tannique ou de rutine (Anon 1981). Un autre brevet revendique que le développement de la couleur, la clarté et la stabilité à la lumière des anthocyanes dans les boissons sucrées sont dus à l'addition de flavones et/ou de flavonols (Katake 1980).

i.b.3.4. Complexation des pigments phénoliques

Dans la nature, les anthocyanes résistent à des conditions d'environnement quelquefois très drastiques : pH cellulaire et température relativement élevée avec une décoloration lente. La compréhension de ces mécanismes de stabilisation in vivo devrait permettre d'apporter des réponses à ces problèmes d'instabilité in vitro. On sait que les anthocyanes tendent à créer entre elles et/ou avec d'autres composés phénoliques, des assemblages dits de copigmentation qui améliorent leur pouvoir colorant, leur tonalité et leur stabilité selon le support. (Escribano-Bailon, Dangles et al. 1996). La

copigmentation est particulièrement importante dans les vacuoles où les polyphénols incolores »s'associent » aux anthocyanes produisant un déplacement bathochrome souvent accompagné d'un effet hyperchrome (Brouillard, Mazza et al. 1989). A l'heure actuelle, on dénombre une quarantaine de molécules pouvant jouer le rôle de copigments : des flavonoïdes, des alcaloïdes, des acides aminés ou des nucléotides. Cependant les molécules qui apportent le plus de stabilité sont les flavonols (quercétine, rutine).

i.b.4. Procédés technologiques d'extraction des anthocyanes

L'extraction des anthocyanes reste un procédé technologique délicat dans la fabrication des colorants anthocyaniques. L'instabilité de ces molécules en solutions neutres ou alcalines implique que les procédés technologiques d'extraction utilisent impérativement des solvants aqueux acidifiés qui ont pour fonction outre de fragiliser les structures membranaires des cellules, de favoriser la récupération des formes flavylium plus stables.

Différents solvants d'extraction (méthanol, éthanol, eau) acidifiés par différents acides (acide acétique, citrique, tartrique, formique, hydrochlorique...) ont été testés. Pour le marc de raisin, le méthanol acidifié est 20% plus efficace que l'éthanol et 73% plus efficace que l'eau (Hang 1988). Quand aux acides, les plus performants avec le méthanol sont l'acide citrique à 5% qui permet d'obtenir une concentration en anthocyanes à 0.008 mg/ml d'extrait, dès les huit premières heures d'extraction et l'acide chlorhydrique à 10% qui donne 0.020 mg/ml d'extrait après 48h d'extraction (Métivier, Francis et al. 1980). Des fortes concentrations en acide conduisent à de faibles quantités de pigments dans les extraits, probablement à cause de l'hydrolyse des anthocyanes libérant des formes aglycones beaucoup moins stables, d'où une perte de pigments.(Wilska-Jeszka 1991).

Les industries agroalimentaires n'utilisent pas le méthanol comme solvant d'extraction mais plutôt l'éthanol acidifié avec de l'acide chlorhydrique, même si cet acide est dur à concentrer en raison de son haut point d'ébullition, ou encore des solutions aqueuses contenant du SO₂. La quantité de SO₂ nécessaire à l'extraction des pigments dépend de la teneur en anthocyanes dans l'extrait : dans le cas du cassis cela varie entre 300 et 1200 ppm de SO₂. Cependant de nombreux travaux montrent que le taux d'anthocyanes extraites du raisin ou encore de calices de tournesol, augmentent avec de fortes concentrations en SO₂. L'extraction avec le SO₂ donne un extrait brut contenant plus de 80% d'anthocyanes. En fait, l'addition de SO₂ au solvant d'extraction permet la formation d'un complexe entre l'anthocyane et l'ion HSO₃⁻. Le SO₂ solubilise les anthocyanes par formation de ce complexe en les dissociant de macromolécules telles que les pectines, cellulose et protéines. (Gao and Mazza 1996) supposent aussi que le SO₂ améliore la diffusion des anthocyanes à travers la paroi de cellules, augmentant ainsi la solubilité des pigments. Le SO₂ a aussi un rôle d'agent réducteur, protégeant les anthocyanes des oxydations. Cette technique d'extraction avec le SO₂ s'applique à plusieurs sources végétales telles que le marc de raisin, le marc de cassis, le sureau, etc...

L'extraction des anthocyanes dépend aussi de la température utilisée. En effet, une augmentation de la température entraîne généralement une diminution de la viscosité, augmentant ainsi significativement la diffusion des molécules dans le solvant. Mais l'augmentation de la température d'extraction avec l'eau sulfitée de 20°C à 80°C conduit à une diminution du taux d'anthocyanes (Mok and Hettiarachchy 1991). (Cacace and Mazza 2002) recommandent plutôt d'extraire les anthocyanes de cassis avec une température comprise entre 30°C et 35°C afin d'éviter la dégradation thermique. Néanmoins, contrairement à l'extraction effectuée avec de l'eau sulfitée, de hautes

températures en présence de solvants hydroalcooliques augmentent l'extraction des anthocyanes de cassis (Cacace and Mazza 2003). Les travaux récents de (Cacace and Mazza 2002) ont montré que plus le ration solvant/solide (Sl/Sd) était grand, meilleure était l'extraction des anthocyanes.

i.b.5. Méthodes d'analyse des pigments et Identification des anthocyanes de la Roselle

La demande des consommateurs pour les colorants naturels ne cessant de croître, les concentrés de jus de fruits rouges deviennent un ingrédient de plus en plus utilisé dans la fabrication de nombreux aliments et boissons.

La coloration rouge d'un végétal n'est pas forcément due aux pigments anthocyaniques. D'autres pigments, comme les bétacyanines ou encore les caroténoïdes sont responsables de la coloration rouge de certains végétaux. Afin de les différencier des tests d'identification rapide s'appuyant essentiellement sur la transformation structurale des anthocyanes sont réalisés. Si l'extrait de pigments contient des anthocyanes, il doit exalter en solution aqueuse acidifiée une coloration rouge vif. En solution alcaline, la coloration de l'extrait devient bleue et enfin la solution se décolore en présence de disulfite de sodium.

i.b.5.1. Identification spectrale des anthocyanes

L'analyse structurale des anthocyanes par spectrophotométrie UV-visible est certainement la plus répandue. Les spectres d'anthocyanes se mesurent dans une solution de méthanol à 0.01% d'acide chlorhydrique. Deux bandes d'absorption distinctes caractérisent les anthocyanes : une bande dans la région des UV (260-280 nm) et une autre dans la région du visible (490-520 nm) (Fuleki and Francis 1968). Les différents aglycones possèdent différentes longueurs d'onde maximales allant de 520 nm pour la pélagonidine à 546 pour la delphinidine. La longueur d'onde maximale dans le visible est liée de près aux groupements hydroxyles des anthocyanes, et leurs monoglucosides montrent donc des longueurs d'onde maximales plus basses d'environ 10 à 15 nm. La nature du sucre substitué n'affecte pas le spectre. Toutefois, des informations sur le groupement substitué par glycosylation de l'anthocyane peuvent aussi être obtenues grâce aux données spectrales. Un 3-glucoside et 3,5-diglucoside possèdent un maximum d'absorption similaire mais montrent des différences dans la région 400-460 nm.

Une autre méthode pour caractériser les anthocyanes est la séparation des classes d'anthocyanes avec l'ion borate. (Hong and Wrolstad 1990) ont observé que lorsque les anthocyanes sont adsorbées sur des cartouches Sep-Pack C18 et éluées avec une solution alcaline de borate, les anthocyanes non acylées contenant un système ortho-dihydroxyle (cyanidine, delphinidine et putonidine) sont préférentiellement éluées alors que les anthocyanes ne contenant pas de groupements ortho-dihydroxyle (pélagonidine, péonidine et malvidine) sont retenues sur la cartouche. Les analyses spectrales donnent des informations utiles sur la nature des anthocyanes, la longueur d'onde maximum dans le visible différenciant les dérivés cyanidine des dérivés delphinidine et pélagonidine. Cependant, les anthocyanes à l'intérieur de chaque classe ne peuvent être différenciées.

i.b.5.2. Dosage et identification des anthocyanes

Dans la plupart des dosages, la technique la plus simple pour déterminer la concentration en anthocyanes reste la spectrophotométrie UV-visible, régie par la loi de Beer-Lambert. Ces méthodes d'analyses quantitatives peuvent être divisées en trois groupes.

➤ Quantification directe

Dans les jus/extraits végétaux, il y a généralement peu de substances qui interfèrent en absorbant dans la même région d'absorption que les anthocyanes (490- 550 nm). En solution acide (méthanol à 0.1% HCl), la concentration totale en anthocyanes peut alors être déterminée grâce à la loi de Beer-Lambert en mesurant l'absorbance de l'échantillon à la longueur d'onde appropriée. Cependant, la self-association et la copigmentation causent des déviations de la loi de Beer-Lambert qui peuvent alors conduire à des imprécisions sur la concentration totale en anthocyanes.

Pour des échantillons contenant un mélange d'anthocyanes, les mesures d'absorbance à des pH acides (pH<3) sont proportionnelles à la concentration totale en anthocyanes. En revanche l'estimation de la concentration d'anthocyanes individuelles dans le mélange peu seulement être obtenue grâce à la connaissance des proportions des pigments individuels au sein du mélange. Quand aux concentrations absolues, elles sont calculées grâce au coefficient d'extinction molaire moyen pondéré et grâce à l'absorbance de la longueur d'onde moyenne pondérée. Des estimations plus précises sont obtenues avec des échantillons contenant un seul pigment prédominant (Giusti, Rodriguez-Saona et al. 1999). Certes, un grand nombre de coefficient d'extinction molaire sont connus, mais il est important de respecter les mêmes solvants et le même pH pour déterminer le coefficient d'extinction à partir de l'absorbance du produit (Tableau I-13).

Tableau I-13: Coefficient d'extinction des principales anthocyanines

Anthocyanines	Solvant	λ (nm)	Coefficient d'extinction molaire ϵ (l.mole ⁻¹ .cm ⁻¹)
Cyanidine-3-glucoside	Tampon aqueux pH 1	510	26900
	0.1 N HCl	520	25740
	Méthanol 1% HCl	530	34300
	Ethanol 10%, pH 1.5	512	18800
Delphinidine-3-glucoside	Méthanol 1% HCl	543	29000
	Ethanol 10%, pH 1.5	520	23700

➤ Quantification par modification de la structure

Dans le cas d'un mélange avec des composés qui interfèrent, les anthocyanes sont dosées chimiquement à l'aide de deux méthodes qui reposent l'une sur la modification de la coloration des anthocyanes en fonction du pH (appelée aussi méthode pH-différentielle), l'autre sur la réaction avec un agent de blanchiment comme le bisulfite de sodium (méthode soustractive) (Wrolstad, Culberston et al. 1982).

La méthode pH- différentielle utilise les transformations structurales réversibles que subissent les anthocyanes en fonction du pH. A pH 1, la forme flavylum prédomine alors qu'à pH 4.5 c'est la forme incolore hémiacétal. La méthode de pH- différentielle permet la mesure précise et rapide de toutes les anthocyanes, même en présence des colorants dégradés, polymérisés et d'autres composés selon le calcul suivant (Wrolstad, Durst et al. 2005) :

$$\text{Équation I-28/} \quad A = (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1.0} - (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4.5}.$$

$$\text{Équation I-29/} \quad [\text{Anthocyanes monomériques}]_{\text{mol.l}^{-1}} = A / (\epsilon * l) .$$

Où ϵ est le coefficient d'extinction molaire (l.mol⁻¹.cm⁻¹) de l'anthocyane majoritaire et l le trajet optique (cm).

$$\text{Équation I-30/} \quad [\text{Anthocyanes monomériques}]_{\text{mg.l}^{-1}} = A * M * FD / (\epsilon * l)$$

Avec M : masse molaire de l'anthocyane (g/mol).

FD : le facteur de dilution.

Quant à la méthode soustractive, elle met en œuvre des agents de blanchiment qui décolorent les anthocyanes mais qui n'affectent pas les substances interférentes. On mesure d'abord l'absorbance maximale de la solution dans le visible à 520 nm puis la solution est décolorée par l'agent de blanchiment et l'absorbance à 520 nm est à nouveau mesurée. On calcule la différence entre les deux absorbances mesurées (sans et avec agent de blanchiment) et la concentration en anthocyanes est calculée par rapport à une droite d'étalonnage préalablement établie selon le même protocole avec un anthocyane étalon. Les deux agents de blanchiment les plus utilisés sont le bisulfite de sodium (Somers and Evans 1974; Wrolstad, Culberston et al. 1982) et le peroxyde d'hydrogène (Swain and Hillis 1959).

Cependant, ces méthodes ont leur limite et notamment lorsque les solutions sont riches en anthocyanes acylés. En effet, ces anthocyanes peuvent ne pas répondre aux changements de pH de la même manière qu'elles ne peuvent se décolorer autant que les anthocyanes non acylés à pH 4,5. Tel est l'exemple de certains pigments rouges dans le vin, qui se condensent avec des tanins et deviennent ainsi moins sensibles aux variations de pH et à la décoloration par SO₂. (Wrolstad, Culberston et al. 1982).

➤ Quantification et identification individuelle des anthocyanes

De manière générale, si la principale molécule d'anthocyane de l'extrait est connue ou peut être identifiée, la teneur totale en anthocyanes des extraits est alors exprimée en terme de composants majoritaires.

Chromatographie liquide en phase inverse :

La chromatographie liquide en phase inverse est la méthode la plus communément utilisée pour séparer et quantifier individuellement les anthocyanes. Il est impossible de décrire une méthode standard d'analyse des anthocyanes du fait que chaque laboratoire développe sa propre méthode en fonction des matières premières étudiées (Merken and Beecher 2002).

Les colonnes C18 sont les plus utilisées pour la séparation des anthocyanes et des polyphénols, mais des colonnes en polystyrène ont aussi été utilisées. Généralement les colonnes ont des longueurs comprises entre 100 et 250 µm, et un diamètre interne de 4.6 mm. Les caractéristiques de séparation des diodes permettent d'obtenir les spectres des différents anthocyanes élués. Le spectre d'absorbance enregistré dans l'UV-visible fournit donc des informations sur la nature de l'aglycone, la glycosylation, la présence ou non de groupements acylés. Les détecteurs à simple longueur d'onde peuvent aussi identifier sélectivement les anthocyanes à condition que l'enregistrement du chromatogramme s'effectue à des longueurs d'onde comprises entre 520 et 546 nm ou aucun autre composé phénolique n'absorbe (Sarni-Manchado and Cheynier 2006).

Les pics chromatographiques sont identifiés grâce aux temps de rétention et à leurs caractéristiques chromatographiques. Pour simplifier les analyses chromatographiques, on a recourt à l'hydrolyse des anthocyanes. Cette hydrolyse des anthocyanes en aglycones (ou anthocyanidines) est le facteur le plus important affectant les temps de rétention en phase inverse. En phase inverse, l'ordre d'élution des aglycones est le suivant : les dérivés de delphinidine sortent en premier, suivis par les dérivés de cyanidine, pétunidine, pélargonidine, péonidine et de malvidine. Avec les aglycones, la

polarité est directement liée avec le degré d'hydroxylation et de méthylation du noyau B. le composé devient plus polaire lorsque le nombre d'hydroxyles augmente et plus apolaire quand le nombre de méthoxyles augmente. La présence de sucres diminue le temps de rétention des anthocyanes. Enfin, l'acylation des anthocyanes provoque une perte de polarité comparée aux composés non acylés, correspondant à une augmentation du temps de rétention.

Il n'est pas correct d'affirmer que tous les 3,5 - diglycosides soient élués en premier suivis par les monoglycosides, les dérivés diglycosides acylés et enfin les dérivés monoglycosides acylés. Certains monoglycosides, acylés ou non, ont été observés avant quelques anthocyanes diglycosides (Sarni-Manchado and Cheynier 2006).

La caractérisation par HPLC des pigments demande une comparaison avec des anthocyanes de référence, aglycones ou glycosylés. Or, la pigmentation des végétaux est rarement due à un seul anthocyane. Plus de 300 anthocyanidines de structures différentes ont été rapportées dans la littérature. Le raisin à lui seul ne contient pas moins de 5 à 30 anthocyanines, selon la variété. Même avec une méthode de séparation performante telle que la HPLC, il serait difficile de calculer la teneur en couleur exacte sans avoir de connaissances antérieures sur le profil anthocyanique de l'extrait. La source d'ionisation la plus utilisée avec le couplage HPLC est l'électrospray (CL-ESI-SM) dont le voltage et la puissance appliquée au cône peuvent varier. Le détecteur est programmé en mode positif ou négatif. D'autres interfaces entre la HPLC et le détecteur de masse existent comme la technique d'ionisation à pression atmosphérique (IPA), technique d'ionisation plus douce que l'électrospray, ou encore la technique de bombardement d'atome rapide à débit continu (CF-FAB).

Schématiquement, les spectres de masse individuels des anthocyanes montrent un pic pour l'ion moléculaire accompagné d'un autre pic correspondant à l'aglycone. Lorsqu'il y a présence d'un groupement acylé, un fragment supplémentaire est détecté correspondant à la perte de la partie acylée de l'ion moléculaire. Les masses des aglycones sont pour la delphinidine, 303 : cyanidine, 287 : pétunidine, 317 : péonidine, 301 : et malvidine, 331. L'addition d'un hexose (anthocyane monoglucoside par exemple) rajoute une masse de 162 à l'aglycone, de deux hexoses (anthocyane diglucoside) rajoute une masse de 324 à l'aglycone.

Electrophorèse capillaire.

L'électrophorèse capillaire est une méthode analytique récente sensible et de haute résolution. Elle permet d'utiliser de très faibles quantités d'échantillon mais aussi des volumes de solvant réduits. On trouve encore peu de données sur la séparation des anthocyanes par cette technique. (Bridle et al., 1997) ont rapporté des travaux menés sur la séparation d'un mélange d'étalons d'anthocyanes et sur celle des anthocyanes de fraise. Cependant, cette méthode n'offre pas la même sensibilité dans la séparation de mélanges complexes d'anthocyanes que celle accomplie par la HPLC.

i.b.5.3. Purification des anthocyanes

Une purification des extraits riches en anthocyanes est le plus souvent nécessaire. En effet, l'extrait initial contient un grand nombre d'autres molécules comme des sucres, des protéines, des acides aminés, des sels minéraux... Il est généralement nécessaire de les éliminer afin d'améliorer la stabilité des extraits. Il existe plusieurs techniques de purification plus ou moins efficace (Lin and Hilton 1980). Les deux procédés technologiques les plus courants sont : la purification sur résine absorbante échangeuse d'ions et la purification sur membranes (ultrafiltration).

Les résines absorbantes sont des résines possédant une structure de résine échangeuse d'ions mais n'ayant aucun site chimique actif fixé sur cette structure. Leur squelette chimique poreux a la propriété d'adsorber certains types de molécules de manière similaire au charbon actif. La solution sortant de la colonne est donc décolorée et contient tous les éléments indésirables. La résine absorbante est choisie en fonction de sa forte affinité pour les anthocyanes. Les résines les plus connues et les plus utilisées sont des copolymères de styrène et polymères de divinylbenzène (ES861) ou encore des résines basées sur des structures polyméthacrylate (XAD, XAD7, XAD8). Les polyphénols ainsi adsorbés sur la résine durant un cycle de saturation sont ensuite élués par de l'éthanol à 70-75% légèrement acidifié avec de l'acide chlorhydrique, afin de « casser » le complexe formé entre l'anthocyane et l'ion HSO_3^- . Ainsi l'éluant récupéré contient des anthocyanes libres qui peuvent être récupérées par évapo - concentration ou distillation.

De manière générale, les colorants naturels extraits de sources végétales avec de l'eau contiennent un large spectre de composés dissous dans lequel les pigments ne constituent qu'un faible pourcentage.

Le procédé technologique le plus répandu pour purifier et concentrer les anthocyanes reste l'ultrafiltration sur membrane. L'ultrafiltration appelée justement filtration à flux transversal ou « cross-flow », est une alternative économiquement intéressante. L'ultrafiltration est spécialement recommandée pour du matériel sensible à la chaleur ; cette méthode purifie et concentre simultanément à de basses températures. Les paramètres les plus importants dans les procédés utilisant les membranes sont les membranes elles-mêmes et la sélection des conditions de filtration du « cross-flow ». L'acétate de cellulose est la membrane la plus communément utilisée, mais sa tolérance au pH et à la température est limitée. Un grand nombre de membranes à base de polysulfone, polyamide, polyimide et polypropylène sont disponibles dans le commerce. La membrane d'acétate de cellulose avec un MWCO de 1000 a été trouvée comme étant la meilleure membrane pour l'ultrafiltration des extraits de marc de raisin. Cette membrane retient les pectines de haut poids moléculaire et permet aux acides organiques et minéraux de passer à travers. Les tanins qui possèdent un poids moléculaire similaire à celui des anthocyanes ne sont pas séparés. L'ultrafiltration des anthocyanes effectuée avec les membranes d'acétate de cellulose peut enlever 75 à 90% d'eau et de 50 à 60% des sucres en un seul passage, et ainsi concentrer deux fois le colorant (Amiot-Carlin 2004).

i.b.5.4. Les anthocyanes de la Roselle

Les anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa* sont les pigments les plus importants et sont de deux types.

L'hibiscine (ou hiviscine) est le pigment majeur responsable de la couleur rouge foncée du calice. C'est une sambubiose-3-delphinidinol.

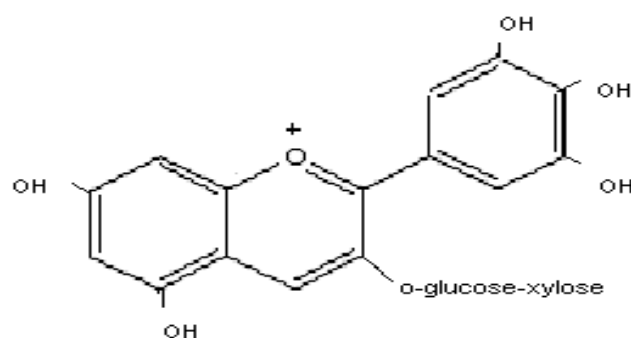


Figure I-12 : structure du sambubiose-3-delphinidol

A côté de l'hibiscine on trouve le sambubiose –3-cyanidol.

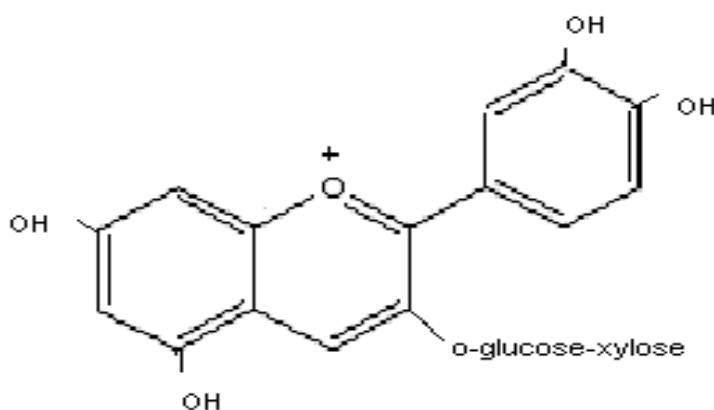


Figure I-13 : structure du sambubiose-3-cyanidol

C'est le deuxième pigment d'*Hibiscus sabdariffa*.

Viennent ensuite deux pigments mineurs : Le glucosido-3-delphinidol et le glucosido-3-cyanidol.

(Du and Francis 1973) ont trouvé une teneur en anthocyanes de 1.5 g/100g de calices de roselle séchés, exprimés en glucoside-3-delphinidol. (karawya, Ghourab et al. 1975) ont isolé le chlorure d'Hibiscine et ont évalué, sur différents échantillons de Roselle d'Egypte, une teneur de l'ordre de 0.25%. (Khafaga and Koch 1980) ont entrepris une étude sur la variation de la quantité d'anthocyanes dans les calices de cinq variétés de Roselle (Egypte, Sénégal, Inde, Thaïlande et Amérique centrale) en fonction du stade de maturité de la fleur. Pendant la croissance du calice, la quantité d'anthocyanes augmente de 1.7 à 2.5 % du poids sec pour les cinq variétés. Le maximum de concentration en anthocyanes est obtenu le plus souvent pendant 10 à 15 jours puis la quantité diminue rapidement dans tous les cas. Le sambubiose-3-cyanidine est l'anthocyanoside majoritaire. Le glucoside-3-delphinidine manque dans la variété d'origine sénégalaise alors qu'elle atteint 25 à 30 % pour celles des autres provenances. Le calice d'*Hibiscus* provenant d'Egypte montre un maximum d'anthocyanes de 30 à 45 jours après la floraison, celui de l'Inde après 35 à 45 jours et celui du Sénégal après 40 à 50 jours. Ceux d'Amérique centrale et de la Thaïlande nécessitent 45 à 50 jours pour atteindre ce stade de maturité.

Du and Francis, (1973) ont déterminé précisément quatre anthocyanes par chromatographie des pigments de Roselle et les identifient par spectrométrie UV/visible/IR ils trouvent surtout :

- + Delphinidine 3-glucose-xylose ou Delphinidine –3-sambubiose
- + Cyanidine-3-sambubiose.
- + Puis en faible quantité :
- + Delphinidine 3-glucose
- + cyanidine-3- glucose

D'autres pigments sont présents en trop faible quantité pour pouvoir être identifiés.

El Gengaihi, (1978) a confirmé par étude d'*Hibiscus sabdariffa* d'Egypte la présence de :

- + Delphinidine 3-glucose
- + Cyanidine-3- glucose
- + Delphinidine 3,5-glucose-xylose

Mais ne retrouve pas de cyanidine 3,5 glucose-xylose.

Khafaga and Koch, (1980) ont retrouvé à partir d'échantillon d'*Hibiscus sabdariffa* de quatre pays différents (Egypte, Inde, Thaïlande et Amérique centrale) les quatre anthocyanes décrits par Du et Francis, 1973.

I-5.2. LES OLIGOSACCHARIDES DES GRAINES DE *TEPHROSIA PURPUREA*

I-5.2.a. PRESENTATION DE LA PLANTE

Les plantes du genre *Tephrosia* sont des plantes subtropicales largement distribuées notamment en Inde ou au Sri Lanka. L'espèce *Tephrosia purpurea* est une plante pérenne de 30 à 100 cm de haut. Elle est dressée ou étalée et très rameuse, les tiges sont florifères, dressées et dominant la plante. Les feuilles à 6 - 8 paires de folioles plus ou moins étroites. Le dessus est glabre et le dessous poilu. Les fleurs sont rose carmin disposées le long de la tige florale, les dents du calice sont plus longues que le tube. Le fruit est un long haricot dont la pointe est recourbée vers le haut.

I-5.2.a.i. Intérêt médicinal de la plante

L'espèce *Tephrosia purpurea* est surtout connue en Inde et essentiellement utilisée en médecine Ayurvédique qui est la médecine traditionnelle du pays. Différentes parties ont été utilisées pour le traitement de diverses maladies, bronchites, maladies du foie et du rein, purification du sang. Les graines de *Tephrosia purpurea* ont également été utilisées dans le cas d'une activité hypoglycémique (Rahman, Kashfudduja et al. 1985). On connaît également l'activité antimicrobienne in vitro de *Tephrosia purpurea*, à partir d'extrait alcoolique à 90% dans un appareil Soxhlet. L'extrait de la plante a été aussi signalé comme ayant une activité contre la Leishmaniose Viscérale (Sharma, Rastogi et al. 2003), immunomodulatoire (Damre, Gokhale et al. 2003).

I-5.2.a.ii. Composition chimique

Tephrosia purpurea est connu pour son importance médicinale, c'est pourquoi plusieurs auteurs l'ont choisie pour une analyse systématique. Un grand nombre de composés appartenant aux stéroïdes (Basu, 1977), la rutine et les roténoïdes (krishna and Ghosh 1938), les flavones et leurs glycosides (Rangaswami and Rao 1959), les flavonones, les isoflavonones, les alcaloïdes, les huiles et acides gras et d'autres composés comme la

quercétine ont été isolés à partir de *Tephrosia purpurea* et d'autres espèces de *Tephrosia*.

Une étude de la composition chimique de la graine a été menée par Joshi, Shrivastava et al., (1979) qui ont déterminé la nature des composés dans les fractions hydrosolubles et liposolubles de la graine. Ainsi, la fraction lipidique comprend majoritairement des acides gras dont les acides palmitiques et oléiques à 83%. La fraction hydrophile quant à elle, est principalement composée de molécules glycosylées (teneur totale de sucres dans le légume de 45,4%) et de protéines (34,5%). Bhatnagar and Kapoor, (2000) a reporté l'isolation et la détermination structurale de l'acétyl fraxinol et de deux nouvelles isoflavones à partir des graines de *Tephrosia purpurea*.

ii.a. Les acides gras

L'huile extraite à partir des graines contient de l'acide palmitique, palmitoléique, stéarique, oléique, linoléique et linoléique.

Tableau I-14 : composition en acides gras de l'huile de graines de *Tephrosia purpurea*

Acide gras	(Joshi, Shrivastava et al. 1979) (%)	(Zafar 1975) (%)
Acide palmitique	38.5	28.2
Acide stéarique	9.4	-
Acide palmitoléique	4.5	-
Acide oléique	45	43.6
Acide linoléique	2.1	30.8
Acide linoléique	0.5	2.4

ii.b. Les acides aminés

La composition de la plante en acides aminés a été rapportée par Joshi, Shrivastava et al., (1979). Il s'agit d'acides aminés indispensables à savoir la lysine, la thréonine et la phénylalanine et des acides aminés dits semi-indispensables tels que l'arginine, la sérine et la glycine.

Tableau I-15 : Principaux acides aminés de la plante *Tephrosia purpurea*

Acides aminés indispensables	(Joshi, Shrivastava et al. 1979) (g/16g de nitrogène)	(Zafar 1975) (g/16g de nitrogène)
Lysine	8.32	8.10
Histidine	1.82	1.74
Thréonine	7.41	8.03
Phénylalanine	6.29	6.42
Valine	2.13	-
Méthionine	-	-
Leucine et isoleucine	8.19	8.91
Acides aminés semi indispensables		
Sérine	8.29	8.62
Glycine	4.96	5.36
Tyrosine	3.46	3.68
Cystéine	-	Traces
Arginine	14.65	14.86
Les acides amines dispensables		
Acide glutamique	30.40	14.36

Acide aspartique	-	16.42
Alanine	1.03	6.48

ii.c. Les roténoïdes

Sharma and Khanna, (1975) ont analysés les roténoïdes dans les racines, la tige et les feuilles de *Tephrosia purpurea*. La quantité de roténoïdes a été plus importante dans les feuilles (1.7%) que dans les racines (1.2%) et la tige (0.6%). La présence d'elliptone, de roténone et de tephrosine a été confirmée.

Zafar and Mujeeb, (2000) ont présenté la teneur en roténoïdes dans diverses parties de la plante.

Tableau I-16: teneur en roténoïdes dans diverses parties de *Tephrosia purpurea*

Partie de la plante	Roténoïdes (%)
Feuilles	0.65-0.80
Tige	0.40-0.65
Racines	0.70-0.95
Graines	1.60-1.80

ii.d. Les flavonoïdes

Rao and Raju, (1979) ont isolé l'isolonchocarpin, un flavonone à partir de l'extrait chloroformique soluble dans l'éther des racines de *Tephrosia purpurea*. C'est le premier travail d'isolation d'un tel flavonoïde optiquement actif à partir d'une source végétale. Ce même composé a été isolé par la suite à partir des graines de cette plante (Gupta, Krishnamurti et al. 1980).

En plus de cette molécule Rao and Raju, (1979) ont isolé trois autres composés cristallins qui sont le lanceolatin A, B et C. Le lanceolatin B et C ont également été isolés à partir des graines.

Gupta, Krishnamurti et al., (1980) ont isolé un nouveau flavonone, la purpurine par chromatographie à partir d'extrait de graines de *T. purpurea* dans le benzène.

Le karanjine a été isolé à partir de l'extrait éthanolique des graines.

L'anthocyane A et B, l'anthocyanidine A et B et le chlorure de delphinidine ont été extraits à partir des fleurs pourpres de *T. purpurea*. L'isolation de la chlorure de delphinidine à partir des fleurs implique une extraction avec de l'éthanol acidifié (1% HCl), suivi par une hydrolyse et une concentration avec 20% HCl à 100°C pendant une heure, l'évaporation de l'anthocyanidine dans l'alcool isoamylique et chromatographie du résidu. Le chlorure de cyanidine est isolé de la même manière.

Le tephrosine, le pangaglabol et le semiglabrane ont été isolés des parties aériennes de la plante.

Pelter, ward et al., (1981) ont isolé et caractérisé plusieurs flavonoïdes peu communs et étroitement liés, à partir des racines de *Tephrosia purpurea*, trois parmi eux étaient nouveaux.

ii.e. Les stéroïdes

Basu, (1977) a isolé le β -sitostérol et le lipoïl à partir de l'extrait des feuilles dans l'éther de pétrole. L'extrait dans le pétrole des graines a donné du sitostérol, du β -sitostérol et du spinastérol. Les stéroïdes spécifiques de l'extrait de la plante dans le chloroforme

sont le stigmastérol, le β -sitostérol, le campésterol, le stigmasta-4-en-3-one et le stigmasta-4-2,2-dien-3-one.

Khanna, Kamal et al., (1977) ont isolé le β -sitostérol à partir de culture cellulaire de *T. purpurea*. Le rendement a été plus important à partir des feuilles (0.37%) comparé à celui obtenu des racines (0.35%) et de la tige (0.07%). Le cholestérol et le stigmastérol ont également été isolés à partir de la culture cellulaire de *T. purpurea* avec un extrait brut total de stérol de 1.7%.

ii.f. Les oligosaccharides

Les α -galactosides, regroupent les oligosaccharides de la famille du sucrose (raffinose, stachyose, verbascose), mais aussi des galactosides de la famille du glucose, appartiennent aux sucres à faible poids moléculaire, non-réducteurs, et solubles dans l'eau (Arentoft and Soˆrensen 1992). Ce sont des α -(1-6)-galactosides liés au carbone n°6 de la partie glucose du sucrose. Des oligosaccharides de la famille du raffinose sont largement distribués dans le règne végétal. Le raffinose (trimère) est un représentant de ce groupe. Indépendamment du raffinose, ce groupe inclut également le stachyose (tétramère), le verbascose (pentamère), l'ajugose (hexamère). Les grandes quantités d'OFR se trouvent dans les parties génératives des plantes supérieures où elles sont impliquées dans des fonctions physiologiques protectrices (Bachmann, Matile et al. 1994).

Le laboratoire Inovations Actifs s'est intéressé à l'extrait hydro-alcoolique de graines de *Tephrosia purpurea*. Il a ainsi prouvé les propriétés intéressantes de cet extrait vis à vis de la thématique « peaux sensibles » (André, Darnault et al. 1995).

Une étude phytochimique de cet extrait a révélé la présence d'une forte proportion d'oligosides. En effet, la chromatographie couche mince haute performance leur a permis de mettre en évidence la présence de monosaccharides, disaccharides, trisaccharides et de tetrasaccharides. D'autre part, une étude par chromatographie liquide haute performance a précisé les hypothèses précédentes à savoir la présence de fructose (monosaccharide), de sucrose (disaccharide), de raffinose (trisaccharide), de stachyose (tetrasaccharide) et d'un dérivé original le cicéritol. Cette dernière technique offre la possibilité de séparer tous les oligosides, leur identification étant réalisée par comparaison avec des molécules étalons.

De manière à confirmer ces hypothèses, une étude par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse (HPLC/ SM) a été effectuée sur l'extrait. Il a été confirmé la présence, dans l'extrait hydro-alcoolique, d'un disaccharide (sucrose), d'un trisaccharide (le raffinose), d'un tetrasaccharide (le stachyose) et d'un autre polyoside, qui correspond au cicéritol.

ii.f.1. Distribution du stachyose et du cicéritol

Le stachyose a été isolé pour la première fois par Planta et Schulze, (1890) à partir des racines de la plante *Stachys tuberifera* qui lui a donné son nom. Il est concentré principalement dans les organes de réserve tels que les racines, les graines, les tubercules... et est souvent trouvé associé au sucrose et au raffinose. Ces trois sucres sont les oligosaccharides les plus communs. Le raffinose se compose en partie d'un sucrose et d'un résidu supplémentaire de galactopyranose. Le stachyose contient un galactopyranose additionnel.

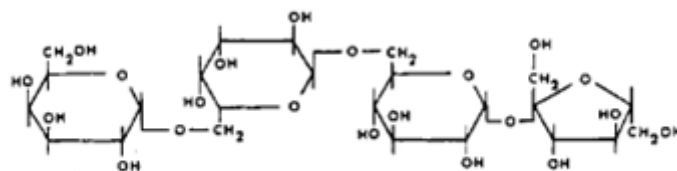


Figure I-14 : Structure du stachyose (Bunton, Huang et al. 1975)

Le cicéritol ou le 1D- α -Dgalactopyranosyl-(1-6)- α -D-galactopyranosyl-(1-2)-4-O-méthyl-*chiro*-inositol a été identifié chez plusieurs légumineuses (pois chiche, lentille, lupin...).

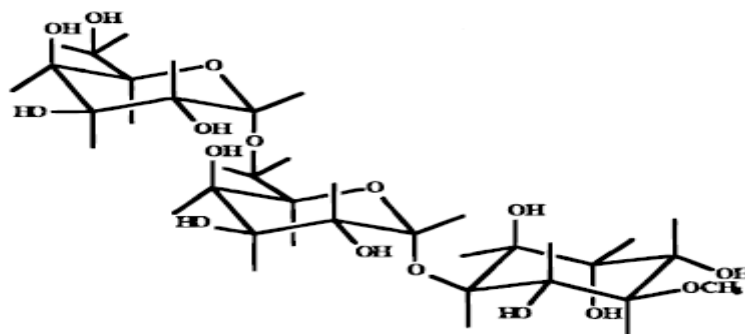


Figure I-15 : Structure du cicéritol

Quemener and Brillouet, (1983) ont isolé dans un extrait éthanolique aqueux des cotylédons de pois chiche un α -D-galactoside de pinitol. Le nom de cicéritol a été donc proposé. Les graines de 7 autres légumineuses commercialement importantes ont été analysées par HPLC et GC. Le Cicéritol a été détecté dans le pois chiche (2.80% dans la graine décortiquée), la lentille (1.60%), le lupin blanc (0.65%) et le soja (0.08%).

Plusieurs études ont été menées sur les graines de lentilles où le cicéritol a été isolé. (Bernabé, Fenwick et al. 1993). Le stachyose et le cicéritol ont été quantifié dans les graines de lentilles, à 120 ng/ mg d'échantillon (Frias, Hedley et al. 1994).

ii.f.2. Extraction des oligosaccharides

Les oligosaccharides sont hydrosolubles et ont en général un pouvoir sucrant 0.3-0.6 fois que le sucrose. En effet, le pouvoir sucrant dépend de la structure chimique, du degré de polymérisation de l'oligosaccharide et des niveaux de mono et de disaccharides dans le mélange (Crittenden and Playne 1996).

L'extraction des oligosaccharides est effectuée généralement au moyen de solvants polaires à savoir, de l'eau à froid ou à ébullition, de l'éthanol, du méthanol ou un mélange hydroalcoolique.

Pour l'extraction des glucides à faible poids moléculaire, comme les oligosaccharides à partir de la matière végétale, le solvant optimal serait l'eau. Cependant, un tel milieu facilite également l'interférence entre les glucides et d'autres substances hydrosolubles telles que quelques polysaccharides en fibres et des protéines (Johansen, Glitso et al. 1996). Ainsi, la plupart des méthodes conventionnelles d'extraction utilisent des concentrations élevées en alcool (Dobrenz, Smith et al. 1993; Oku, Sawatani et al. 1998). Un avantage d'employer l'éthanol à 80% est que des polymères avec un degré de polymérisation (DP)>20 sont précipités et n'interfèrent pas ainsi avec les oligosaccharides solubles dans l'alcool.

En outre, les α -amylases et les α -galactosidases présentes dans la matière végétale peuvent dégrader l'amidon et les oligosaccharides de raffinose si elles ne sont pas inactivées pendant ou avant l'extraction. L'extraction avec des alcools aqueux réduit au minimum ces problèmes, mais la concentration de l'alcool, la température et la méthode d'extraction, varient considérablement. Une concentration de 80% d'éthanol ou méthanol (v/v) est le plus généralement employée, mais d'autres résultats montrent que ces solvants rendent incomplète l'extraction de ces molécules. Il a d'autre part été prouvé que l'augmentation de la concentration d'alcool entre 50-90% (v/v) permettait de réduire fortement la quantité d'oligosaccharides à base de raffinose extraits à partir de la matière végétale. En outre, des rendements d'extraction plus grands ont été notés avec du méthanol comparé à l'éthanol (Shukla 1987).

Knudsen, (1986) a trouvé des résultats similaires entre l'extraction à l'eau à 60°C et avec de l'éthanol à 80% à ébullition.

Bach Knudsen and Betty, (1991) ont étudié 18 échantillons de repas ou de gâteau dérivés du soja, coton, tournesol, et graines de colza et deux échantillons de pois fourragers. Les milieux d'extraction les plus appropriés sont l'eau ou 50% et 80% (v/v) d'alcool (méthanol ou éthanol) pour les échantillons de repas à base respectivement de soja et de graines de coton.

ii.f.3. Analyses et quantification

Les techniques chromatographiques les plus généralement utilisées pour la quantification des oligosaccharides sont la chromatographie gaz- liquide (CGL) avec les colonnes pour la séparation des éthers triméthyliques silyliques (ETS) ou des oximes, et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) avec les colonnes de silice sur lesquels sont greffés des groupements aminés (NH_2), les colonnes C18 en phase inverse (Kennedy, Mwandemele et al. 1985), et les colonnes à résine échangeuse d'ions (Kuo, VanMiddleworth et al. 1988). Les deux techniques chromatographiques ont des avantages et des inconvénients (Folkes 1985). Les avantages les plus notables de la technique de CGL sont la stabilité élevée, la résolution de la colonne et la sensibilité du détecteur à ionisation de flamme. Le besoin de séchage et de dérivation a été fréquemment mentionné comme inconvénient important.

Ces dernières années, la HPLC est devenue populaire principalement en raison de la facilité de préparation d'échantillon; il n'y a plus besoin de sécher l'extrait ou de préparer des dérivés. Cependant, la purification d'échantillon pour beaucoup de types de matières végétales est tout aussi laborieuse que la préparation d'échantillon pour la quantification par CGL (Macrae and Zand-Moghaddam 1978).

Bien que les colonnes et les détecteurs de HPLC aient été rapidement développés ces dernières années, la séparation, le temps d'élution, et les limitations du détecteur (détecteurs réfractométrique) sont parmi les contraintes principales de la quantification des sucres par HPLC.

De telles méthodes de détection ont ainsi prouvé leur utilité dans la détection de quantités élevées d'un grand nombre de composés connus dans les plantes ; le couplage à des spectromètres de masse plus sensibles devrait être avantageux vu qu'il permet en même temps de quantifier des composés connus et d'identifier les métabolites inconnus. Malheureusement, la chromatographie d'échange ionique implique des solvants de HPLC avec des concentrations élevées en sels inorganiques non volatiles, ce qui rend le couplage à la spectrométrie de masse à peine applicable. Alternativement, des réactifs volatils tels que la tri-éthylamine peuvent être ajoutés pour améliorer la séparation pour les anions inorganiques tels que les composés aromatiques sulfatés ; cependant, les

produits organiques polaires neutres comme des oligosaccharides ne forment pas des paires d'ion avec de tels réactifs. La chromatographie d'interaction hydrophile est une méthode alternative de séparation des composés fortement polaires. Son efficacité a été démontrée pour les glucides simples et complexes, les peptides, et d'autres produits d'origine végétale. Le mécanisme de rétention a été proposé pour être une interaction des parties polaires comme des groupements hydroxyles avec la phase stationnaire comme avec les éluants liquides organiques ou aqueux (Tolstikov and Fiehn 2002).

PARTIE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

L'objectif du présent travail est d'étudier et d'optimiser le procédé d'extraction de principes actifs à partir de la matrice végétale, en insérant un traitement de texturation par détente instantanée, avant l'extraction par solvant. Un tel travail suppose la maîtrise de nombreuses méthodes de traitement et d'analyse.

Cette partie est consacrée à la présentation de l'ensemble du matériel et des protocoles expérimentaux que nous avons utilisés au cours de nos travaux.

Dans un premier chapitre de cette partie, sont précisées l'origine et la nature des matières premières qui ont servi de support à l'étude.

Nous présentons, par la suite une description des outils et réacteurs de prétraitement, par détente instantanée contrôlée DIC et plus spécifiquement le réacteur dit "DIC-MP" qui a été utilisé avec, comme gaz de traitement, la vapeur sous pression.

Un troisième chapitre de cette partie est consacré au détail de toutes les techniques d'extraction qui ont été utilisées pour les différents produits.

Un quatrième chapitre de cette partie est consacré au détail de toutes les techniques d'analyse qui ont permis de caractériser et de quantifier les différents principes actifs extraits.

Enfin un dernier chapitre de cette partie présente l'approche statistique et le choix du domaine de variation des paramètres opératoires choisis. Il s'agit de définir les combinaisons des différents paramètres opératoires adoptés, en les faisant varier dans un domaine donné, au moyen des plans d'expériences. Le traitement des résultats est alors effectué sur la base de la méthode des surfaces de réponse multiparamétriques.

CHAPITRE II-1.

TRAITEMENTS

II-1.1. MATIÈRES PREMIÈRES

Les produits que nous avons étudiés tout au long de ce projet de thèse, sont les graines de *Tephrosia purpurea* et les calices d'*Hibiscus sabdariffa*.

II-1.1.a. GRAINES DE *TEPHROSIA PURPUREA*

Les graines de la plante *Tephrosia purpurea*, nous ont été fournies par le département Innovation Actifs (DIA) (ex laboratoire d'actifs, biologie et cosmétiques) appartenant à LVMH recherche. Ces graines en provenance d'Inde, nous sont parvenues tout autant sous forme de graines broyées, qui correspondent au type de produit utilisé lors d'extraction d'actifs à l'échelle industriel, que des graines entières.

L'humidité initiale de ces graines a été mesurée par étuve et a été estimée à 9 g/100g de produit.

II-1.1.b. CALICES DE ROSELLE (*HIBISCUS SABDARIFFA*).

Dans ce travail, deux lots de calices de Roselle ont été étudiés. Le premier lot nous a été envoyé de Malaisie, et le deuxième a été acheté en Egypte. Dans la suite du travail, on précisera laquelle des deux variétés a été utilisée en fonction des travaux effectués.

Pour la variété de Malaisie, l'humidité initiale de ces calices a été mesurée par étuve et a été estimée à 12 g/100g de produit. En ce qui concerne la variété d'Egypte l'humidité initiale est de 15 g/100g de produit.

II-1.2. PRETRAITEMENT

Nous cherchons dans le cadre de ce travail à étudier les effets des traitements hydro-thermo-mécaniques sur l'extraction de principes actifs à partir des graines de *Tephrosia purpurea* (oligosaccharides) et des calices de Roselle (anthocyanes). Ces traitements hydro-thermo-mécaniques conduisent à une micro-alvéolation impliquant une modification des propriétés de la matière (augmentation de la surface spécifique, cassure de parois cellulaires, création de pores...). Ces modifications laissent espérer une amélioration de l'opération d'extraction en termes de cinétique et de rendement global.

II-1.2.a. REHUMIDIFICATION

Afin d'étudier l'effet de la teneur en eau initiale des produits étudiés sur l'opération d'extraction, on a procédé à une modification de celle-ci par réhumidification ou par simple ajout d'une quantité d'eau afin d'atteindre le niveau de teneur en eau voulue calculée comme suit :

Tableau II-1: calcul de la quantité d'eau à ajouter pour la réhumidification

Humidité initiale du produit	Hi
Teneur en eau voulu (g H ₂ O/ 100g MS)	Wf
Poids de l'échantillon à réhydrater (g)	P
Masse d'eau initiale dans cet échantillon	meau=Hi*P
Masse en eau après réhydratation (g H ₂ O/ 100g MS)	Meau= Wf*(P- meau)
Masse d'eau à ajouter	ΔM= Meau- meau

Le lot témoin (matière première non traitée par DIC) est également réhydraté à la teneur en eau du niveau central.

II-1.2.b. TRAITEMENT DIC

II-1.2.b.i. Principe

La technologie de Détente Instantanée Contrôlée DIC consiste à réaliser une chute abrupte de pression (détente instantanée) amenant le produit à une pression relativement basse (généralement voisine de 3500 Pa) à la suite d'un traitement thermomécanique (température de 60 °C à 200 °C couplée à une pression de quelque 0.1MPa de vapeur d'eau). Le procédé est bien contrôlé aux deux niveaux de la température ($\pm 2^\circ\text{C}$) et de la durée de l'opération (± 2 s). La vitesse de passage puis l'équilibre thermodynamique impliquent une expansion du gaz (dans notre cas la vapeur) et une vaporisation d'une certaine quantité d'eau de la matière. La courte durée de l'opération réduit considérablement les phénomènes d'échange et de transfert thermique entre le système du produit et le milieu extérieur ; le phénomène de vaporisation sans échange de chaleur avec l'extérieur, baptisé « autovaporisation », est tout naturellement couplé à une baisse de température et un refroidissement du produit.

Le réacteur DIC utilisé dans cette étude est le réacteur Moyenne pression (MP) ; il est caractérisé, comme tous les autres réacteurs DIC, par une connexion très rapide (qualifiée d'instantanée) entre la chambre de traitement (de volume réduit) et le réservoir à vide (de volume cent fois environ supérieur à celui de la chambre de traitement). Un réacteur DIC comporte, tout naturellement, quatre parties principales :

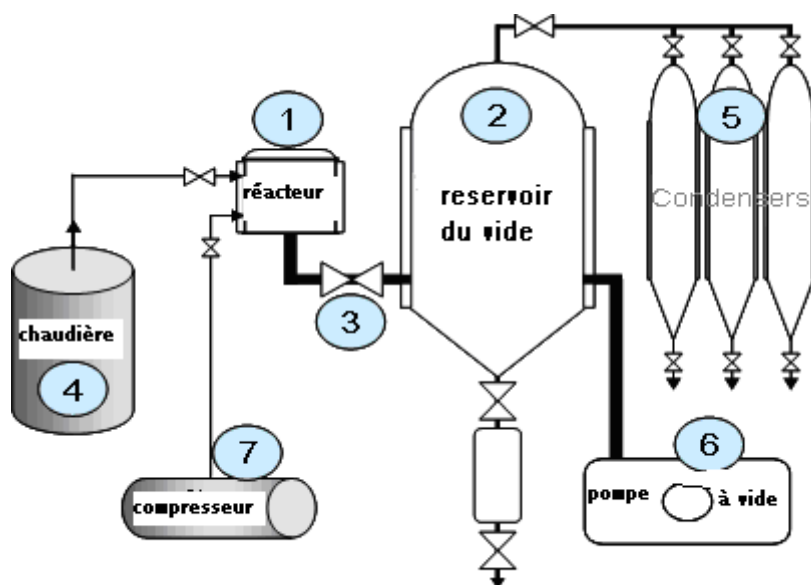


Figure II-1 : Présentation schématique du réacteur DIC : 1- Chambre de traitement ; 2- Réservoir de Vide ; 3- valve de la détente instantanée contrôlée ; 4- un générateur de vapeur (pression maximale de 7 bars) ; 5- Condenseur ; 6- Pompe à Vide ; 7- compresseur d'air (pression allant jusqu'à 10 bars).

1. Une chambre de traitement de haute température (de l'ambiante à 200 °C) et/ou de haute pression (de 0 à 11 0.1MPa), de vapeur d'eau et/ou d'air comprimé : dans le cas du réacteur DIC utilisé, elle est de forme cylindrique de 22 cm de diamètre et de 12 litres de volume.
2. Un système de connexion : La chute abrupte de pression (détente instantanée) est assurée grâce à une vanne de grand diamètre assurant une ouverture en une très faible durée, assurant une connexion tout autant rapide entre la chambre de traitement et le réservoir à vide. Il s'agit d'une vanne sphérique électropneumatique de 20 cm de diamètre, ce qui permet d'obtenir la chute de pression vers le vide en une durée inférieure à 100 ms. En vue de contrôler le

temps de chute de pression et de pouvoir réaliser des détente « non instantanées », nous pouvons disposer d'une série de diaphragmes adaptés à la vanne, à orifice de diamètres variables, allant de 2 à 90 mm. Le Tableau II-2 donne la durée de la détente, c'est à dire le temps pour passer d'une pression de 0,5 MPa à 20 kPa dans la chambre de traitement en fonction du diamètre des ouvertures du diaphragme.

Tableau II-2: Equivalence entre ouvertures des diaphragmes et durée de la détente

Diamètre en mm	Section en mm ²	Durée de la détente en ms
1,00	0,79	3 134
2,00	3,14	2 850
6,00	28,27	2 580
10,00	78,54	2 120
20,00	314,16	460
90,00	6 361,72	150
200,00	31 415,90	33

3. Un système à vide : une pompe à anneau liquide de 4 kW (HIBON, France) permet d'établir un niveau de vide voisin de 4 kPa dans un réservoir de volume de 1600 litres soit 133 fois supérieur à celui de la chambre de traitement. Ce réservoir est muni d'une double enveloppe, ce qui permet, par circulation d'un fluide de refroidissement, de contribuer à l'instauration du vide dans ce réservoir ; le niveau de vide minimum pouvant ainsi atteindre 2,5 kPa.
4. Un système d'acquisition et de commande automatique : Un système de capteurs, de cartes électroniques et de logiciel d'acquisition permet l'acquisition et le stockage des données sur un ordinateur. Le paramétrage et le fonctionnement sont gérés par un boîtier d'automate programmable.

II-1.2.b.ii. Protocole de traitement DIC

Une quantité de 150 g environ d'échantillon convenablement réhumidifiée (graines broyées de *Tephrosia purpurea*) ou non (calice de Roselle) est soumise à une pression de vapeur d'eau (de 10^5 à $6 \cdot 10^5$ Pa) maintenue constante pendant le temps de traitement ; intervient alors une détente "instantanée" ($\Delta P/\Delta t > 5 \cdot 10^5$ Pa.s⁻¹) vers le vide (~5000 Pa). La chute abrupte de pression provoque une autovaporisation partielle de l'eau contenue dans le produit, induisant un refroidissement. Un faible flux d'air se détendant vers le vide juste à la surface du produit permet d'en accélérer le refroidissement.

II-1.3. OPERATION D'EXTRACTION

L'extraction par solvant a été réalisée sur les produits traités et non traités par DIC (témoin) afin d'effectuer une étude comparative de l'effet de la texturation par DIC sur les cinétiques et le rendement d'extraction de différentes molécules (oligosaccharides et anthocyanes).

II-1.3.a. EXTRACTION DES OLIGOSACCHARIDES

L'extraction des oligosaccharides (stachyose et cicérol) a été faite à partir des graines broyées de *Tephrosia purpurea*. Les graines broyées (10 g) ont été placées dans un ballon à fond plat, auquel on a rajouté une quantité de 100 ml du solvant d'extraction (éthanol/eau : 70/30 (v/v)). Le ballon est connecté à un réfrigérant et placé dans un bain-marie à température de 45°C en maintenant une agitation à l'aide d'un barreau aimanté. A des intervalles de temps déterminés, des prélèvements d'un volume de 1ml

chacun sont récoltés à l'aide d'une seringue puis filtré (filtre seringue 0.54 μm) avant la quantification par HPLC.

Après essai de cette méthode d'extraction, on s'est rendu compte qu'on a été obligé à chaque fois de diluer les échantillons au 1/5ème pour être dans la gamme de concentration des standards ou étalons, c'est pourquoi on a décidé de prendre lors de l'extraction une quantité d'échantillon de 2g au lieu de 10g.

Des essais d'extraction avec les deux méthodes ont été réalisés, et le résultat a montré qu'il n'y a pas d'effet négatif sur la cinétique et le rendement d'extraction des oligosaccharides bien au contraire, vu que le rapport M/V diminuait. On a opté donc de faire l'extraction avec 2 g d'échantillon dans 100 ml de solvant.

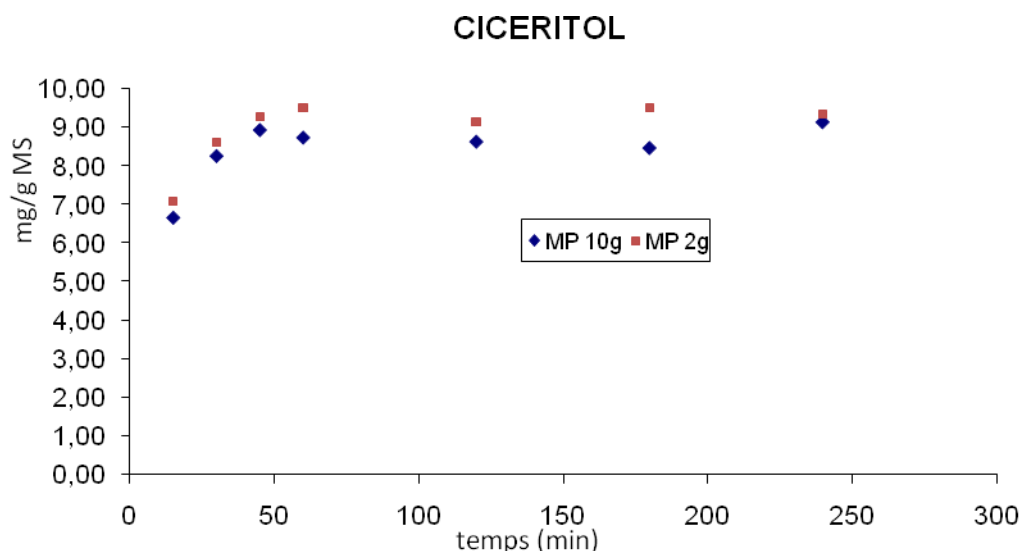


Figure II-2 : Cinétique d'extraction du cicéritol en fonction de la masse d'échantillon de départ.

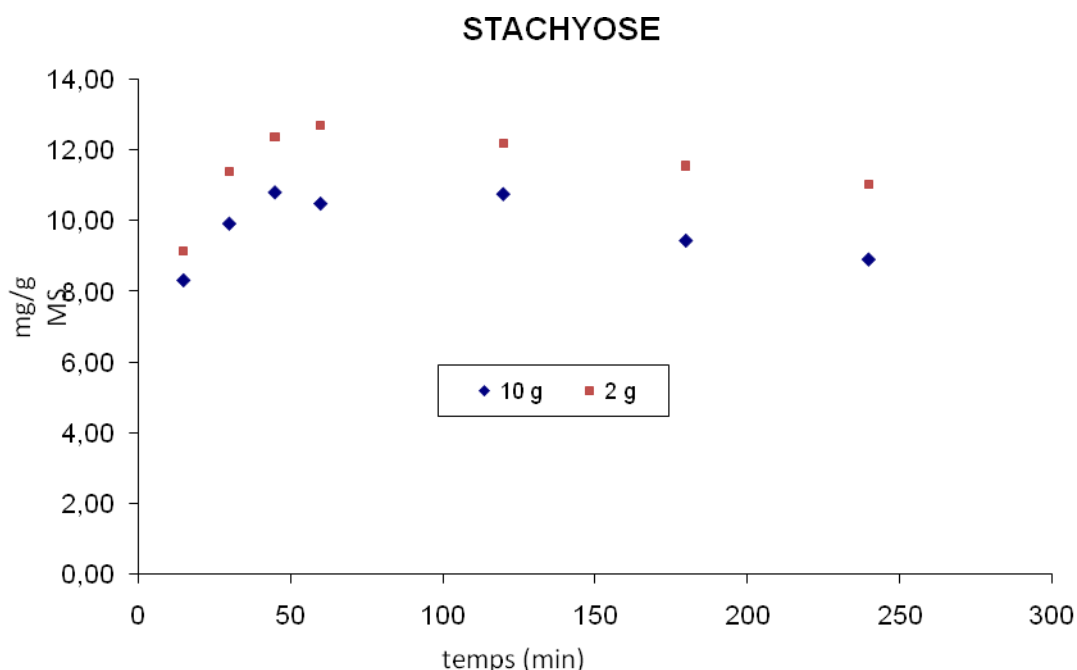


Figure II-3 : Cinétique d'extraction du stachyose en fonction de la masse d'échantillon de départ



Figure II-4 : montage d'extraction des oligosaccharides à partir des graines de *Tephrosia purpurea*

II-1.3.b. EXTRACTION DES ANTHOCYANES

L'extraction des anthocyanes à partir des calices de Roselle de Malaisie a été testée dans deux solvants selon les procédures suivantes :

- ✚ Dans l'éthanol acidifié (HCl 1%) à froid (4 °C) durant 24 heures (prélèvements à t= 1 ; 2 ; 4 ; 6 ; 8 et 24 h).
- ✚ Dans l'eau bouillante, sous agitation (250 rpm) durant 10 minutes (prélèvements à t= 30s; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 et 10 min).

Le rapport masse d'échantillon (2g) / volume de solvant (200 ml) a été maintenu constant et égal pour ces deux protocoles. Chacun des prélèvements a été filtré (filtre seringue 0,2µm) avant la quantification. Pour les anthocyanes extraites à partir de calices de Roselle provenant d'Egypte, seul le protocole d'extraction à l'eau bouillante a été testé. La comparaison des deux modes d'extraction est présentée dans les tableaux suivants (Tableau II-3 et Tableau II-4) :

Tableau II-3 : Extraction à l'eau bouillante des anthocyanes à partir de la Roselle

Temps (min)	MP	MP1	MP2	moyenne	Erreur estimée	Ecart type (%)
0.5	2.16	1.93	1.97	2.02	0.12	6,00
1	3.38	3.28	2.95	3.21	0.22	7,02
2	5.08	4.85	4.90	4.94	0.12	2,45
3	6.01	5.92	5.91	5.95	0.05	0,90
4	6.97	6.65	7.03	6.88	0.20	2,95
5	7.22	7.20	7.56	7.33	0.21	2,80
6	7.53	7.74	8.01	7.76	0.24	3,06
7	8.15	8.18	8.43	8.25	0.16	1,88
8	8.25	8.58	8.71	8.51	0.24	2,80
9	8.28	8.82	8.82	8.64	0.31	3,61
10	8.56	8.97	8.93	8.82	0.23	2,60

Tableau II-4 : Extraction à l'éthanol des anthocyanes à partir de la Roselle

Temps (h)	MP	MP1	MP2	moyenne	Erreur estimée	Ecart type (%)
1	1.19	1.33	1.53	1.35	0.17	12,57
2	1.80	1.88	2.29	1.99	0.26	13,13
3	2.44	2.38	2.73	2.52	0.19	7,45
4	2.93	2.89	3.32	3.05	0.24	7,79
6	3.83	3.66	4.46	3.98	0.42	10,65
8	4.36	4.35	5.20	4.64	0.49	10,53
24	8.48	7.59	9.26	8.44	0.84	9,90

CHAPITRE II-2.

ANALYSES ET QUANTIFICATION

II-2.1. MESURE DE L'HUMIDITE

La détermination de la teneur en eau des échantillons a été réalisée par dessiccation. Après homogénéisation du produit, réduit en fins morceaux, 2 à 5 g d'échantillon ont été introduit dans une capsule. La capsule a été par la suite introduite dans l'étuve chauffée à 105 °C, et incubée jusqu'à un poids constant.

Le taux d'humidité, exprimée en pourcentage par rapport au poids frais des échantillons, est donné comme étant :

Équation II-1 :
$$\text{Taux d'humidité} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} * 100 \quad (\text{g}/100 \text{ g de base humide}).$$

Quant à la teneur en eau des échantillons, exprimée en on peut écrire :

Équation II-2 :
$$\text{Teneur d'humidité} = \frac{m_1 - m_2}{m_2} * 100 \quad (\text{g} / 100 \text{ g de matière sèche}).$$

Où :

m_1 : la masse de la prise d'essai avant séchage.

m_2 : la masse de la prise d'essai après séchage.

II-2.2. MESURE DE LA MASSE VOLUMIQUE INTRINSEQUE

La masse volumique intrinsèque ou réelle ρ_{int} (kg/m³) concerne la matière proprement dite. Elle est déterminée à l'aide d'un pycnomètre à gaz (hélium) à 20 °C. La méthode pycnométrique utilisée repose sur la mesure du volume de fluide déplacé par l'échantillon à une température constante. Le principe de la mesure est basé sur la théorie des gaz parfaits ; il consiste à quantifier la variation de pression (et donc de volume) due à la présence de l'échantillon dans une enceinte calibrée. L'erreur de mesure englobant la variabilité du produit est comprise entre 0,0016 et 0,0047 selon le produit.

II-2.3. QUANTIFICATION DES OLIGOSACCHARIDES

La quantification des marqueurs (cicéritol et stachyose) dans l'extrait a été effectuée par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC). Un chromatographe Agilent 1100, équipé d'un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL) et d'une colonne Lichrospher 100 Diol (125*4 mm, 5 µm) (MERK) a été utilisé.

II-2.3.a. CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES

Eluants :

- ✓ Solvant A : Eau
- ✓ Solvant B : Acétonitrile

Gradient : Démarrer à 5% de A et passer à 50% de A en 30 minutes.

Revenir aux conditions initiales en 5 minutes et stabiliser le système pendant 5 minutes.

Volume d'injection : 20 µl.

Débit d'élution : 1ml/min.

Détection : détecteur à diffusion de lumière (Sedex 45, Sedere, Vitry sur Seine, France).

PM =7.

P_{air}= 2 bars.

T° = 43 °C.

Calibration : polynomiale d'ordre 2.

II-2.3.b. LA GAMME D'ETALONNAGE

Les deux composés ont été quantifiés par rapport à un étalon qui est le sucrose. Plusieurs concentrations ont été préparées par dilution à partir d'une solution très concentrée appelé solution mère.

- ✓ Solution mère : 50 mg de sucrose + 10 ml d'eau/éthanol (30/70).
- ✓ Etalon 1 : 0,3 ml de solution mère + 10 ml d'eau/éthanol (30/70).
- ✓ Etalon 2 : 0,7 ml de solution mère + 10 ml d'eau/éthanol (30/70).
- ✓ Etalon 3 : 1 ml de solution mère + 10 ml d'eau/éthanol (30/70).
- ✓ Etalon 4 : 1,5 ml de solution mère + 10 ml d'eau/éthanol (30/70).
- ✓ Etalon 5 : 2 ml de solution mère + 10 ml d'eau/éthanol (30/70).

II-2.4. QUANTIFICATION DES ANTHOCYANES

La détermination de la concentration totale en anthocyanes monomériques, extraits à partir de calices de Roselle, a été effectuée par spectrophotométrie selon la méthode différentielle du pH (Giusti and Wrolstad R. E. 2001; Wrolstad, Durst et al. 2005). Les anthocyanes individuels ont été quantifiés par HPLC.

II-2.4.a. QUANTIFICATION PAR SPECTROPHOTOMETRIE

II-2.4.a.i. Réactifs

Deux solutions ont été utilisées :

Solution tampon pH 1 (solution aqueuse de chlorure de potassium).

Solution tampon pH 4.5 (solution aqueuse d'acétate de sodium).

L'eau purifiée est utilisée comme référence (blanc).

II-2.4.a.ii. Matériels

Le matériel utilisé dans les protocoles d'analyse par spectrophotométrie est formé de :

- ✚ pHmètre Denver Instrument Company modèle 15.
- ✚ Micropipettes (volume de prélèvement 100 à 1000 µl et 1 à 5 ml).
- ✚ Spectrophotomètre (Thermospectronic Hélios β).
- ✚ Cuves en verre (volume 3 ml).

A partir des prélèvements effectués à différents temps d'extraction, chacun des aliquots est divisé en deux échantillons dilués respectivement dans deux solutions tampons à pH : 1 et à pH : 4,5 (à savoir 600 µL d'échantillon dans 2,4 ml de solution tampon pour un volume total égal à 3 ml qui correspond au volume des cuves en quartz utilisées pour la mesure de l'absorbance). Une telle dilution (au cinquième) permet de conserver l'effet du tampon et de rester dans la gamme d'absorbance fiable du spectrophotomètre ($D.O < 1,5$). Les solutions diluées sont alors laissées pour s'équilibrer pendant 20 min.

La mesure de l'absorbance est ensuite effectuée pour chaque échantillon dilué (pour pH : 1 et 4,5) à la longueur d'onde maximale visible du mélange ($\lambda_{vis-max} = 520 \text{ nm}$) et à 700 nm contre un échantillon d'eau purifiée, utilisé comme blanc. La lecture à 700 nm permet de corriger l'absorbance d'éventuelles molécules en suspension.

L'absorbance de la solution d'échantillon diluée est alors calculée selon la formule suivante :

$$\text{Équation II-3 : } A = (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{700nm})_{pH1,0} - (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{700nm})_{pH4,5}$$

A partir de l'absorbance A ci-dessus, la concentration en anthocyanes monomériques totaux (mg/L) est calculée selon la loi de Beer-Lambert ($A = \epsilon lc$):

$$\text{Équation II-4 : } \text{Anthocyanes monomériques totaux en mg/l} = (A * PM * DF * 1000) / (\epsilon * l).$$

Avec :

PM : Poids Moléculaire de la molécule majoritaire (Delphinidine-3-sambubioside) (g/mol).

DF : Facteur de dilution (ici $DF = 5$).

ϵ : coefficient d'absorption molaire de l'espèce majoritaire dans le solvant considéré ($l / (\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1})$).

II-2.4.a.iii. Gamme d'étalonnage

Etant donné que l'anthocyane majoritaire de la Roselle est la Delphinidine-3-sambubioside, et sachant que nous ne disposons pas de standard correspondant à cette molécule, nous avons opté pour le choix de la delphinidine-3-glucoside. Six solutions aqueuses acidifiées (1% HCl ; pH=1.1) de concentrations croissantes en standard de Delphinidine-3-glucoside (5 ; 10 ; 25 ; 50 ; 75 et 100 mg/l) ont été réalisées à partir d'une solution mère à 1250 mg/l. La lecture de l'absorbance de ces solutions a révélé qu'à partir de la concentration de 50 mg/l, on obtenait des absorbances supérieures à 1,5 ; on s'est donc limité aux trois premières concentrations. Le tracé de l'absorbance à 520 et 700 nm, de ces solutions, en fonction de la concentration de l'étalon permet de déterminer le coefficient d'absorption molaire ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) de cette molécule. On trouve :

$$\text{Équation II-5 : } \epsilon (\text{Dp-3-glu}) = 27481 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} (R^2 = 0,9956).$$

II-2.4.b. QUANTIFICATION PAR HPLC

La séparation des anthocyanes a été effectuée par HPLC (Agilent 1100) équipée d'une pompe quaternaire et d'un détecteur à barrette de diode (DAD). La colonne analytique utilisée est une colonne stable pour des pH allant jusqu'à 1,5 (Kromasil RP-C18 : 5µ, 150mm * 4,6 mm).

II-2.4.b.i. Conditions chromatographiques

L'éluant utilisé a été établi avec deux solutions :

- ✓ Solvant A : acide formique 10%.
- ✓ Solvant B : Acétonitrile.

Le gradient d'élution a été le suivant :

T (min)	A : acide formique 10%	B : Acétonitrile pur
0	95%	5%
20	72%	28%

Le volume d'injection a été de 20 µl, le débit d'élution de 1ml/min et la détection réalisée à 520 nm, avec un spectre d'absorption entre 200 et 600 nm. La Température de la colonne a été fixée à 40 °C.

II-2.4.b.ii. Gamme d'étalonnage

Deux solutions standards de Delphinidin-3-glucoside (Dp-3-Glu) et Cyanidin-3-glucoside (Cyn-3-Glu) diluées dans de l'eau acidifiée (1% HCl ; pH = 1,1) sont injectées (en double) en HPLC selon les mêmes conditions que les échantillons. Une courbe d'étalonnage est ainsi établie pour chaque étalon. Le rapport entre la concentration en standard (0 ; 5 ; 10 ; 25 ; 50 ; 75 et 100 mg/L) et l'aire du pic correspondant donne une équation (concentration = aire pic * facteur F) qui permet de déterminer la concentration en mg/L des différents anthocyanes dans les extraits. La concentration est ensuite ramenée comme pour la méthode au spectrophotomètre en mg d'anthocyanes par g de matière sèche.

Tableau II-5: courbe de calibration de la Dp-3—glu et du Cyn-3-glu

Composé	Temps de rétention	Courbe de calibration	R ²	concentration (mg/l)
Dp-3-glu	7.76	y=0.0162 x	0.9998	5-100
Cyn-3-glu	9.07	y=0.0149 x	1	5-100

II-2.4.c. IDENTIFICATION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

La spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide, permet d'identifier les différents composés séparés selon les conditions précédentes.

La caractérisation des anthocyanes extraits a été effectuée par electrospray LC/MS-ES (Agilent 1100 LC/MSD Trap VL), avec une séparation par chromatographie respectant les conditions décrites précédemment dans le tableau II-3. L'ensemble du système HPLC provient de chez Agilent. La détection MS et la fragmentation en modes positif et négatif ont été réalisées dans les conditions suivantes : azote en tant que gaz vecteur avec un débit de 15 L/min, une température de 350 °C et une pression de nébulisation de 60 psig ; intervalle d'analyse de 100 à 800 m/z avec 5 moyennes et 13 000 m/z par seconde de résolution.

II-2.5. EXPLOITATION DES RESULTATS

Les résultats concernant la quantité de soluté extraite sont donnés sous forme de teneur dudit soluté par unité de matière sèche :

Équation II-6
$$Y=f(t)$$

où Y est la quantité de soluté extraite dans le solvant normalisée par rapport à l'unité de masse de la matière sèche traitée (mg/g de MS).

Devant partir de l'analyse fondamentale et de la solution de la loi de Fick à travers les relations de Crank (§I-3.4.c.i), nous aurons à exprimer la teneur X du soluté dans le

solide, en fonction de la quantité Y extraite, qui est expérimentalement mesurable. L'Équation I-24 devient :

$$\text{Équation II-7} \quad \frac{Y_{\infty} - Y}{Y_{\infty} - Y_0} = \sum_{i=1}^{\infty} A_i \exp(-q_i^2 \tau)$$

Avec A_i , q_i , τ et dp , des constantes définies dans l'Équation I-25.

En utilisant le premier terme de la série, dans le cas d'une sphère ou d'une plaque infinie, la pente $k = (-q_1^2 D_{\text{eff}} / dp^2)$ permet de déterminer la diffusivité D_{eff} .

On a opté pour un développement limité à $i=1$, les courbes de cinétique d'extraction des solutés suivent alors une allure exponentielle selon l'équation :

$$\text{Équation II-8 :} \quad Y = Y_{\infty} (1 - A e^{-kt})$$

Ou encore :

$$\text{Équation II-9} \quad R = \frac{Y_{\infty} - Y}{Y_{\infty} - Y_0} = A \exp(-kt)$$

Avec :

A, K : des constantes

t : temps d'extraction (s)

Y : teneur en soluté dans l'extrait à l'instant t

Y_{∞} : teneur en soluté dans l'extrait pour un temps $t \rightarrow \infty$

Y_0 : teneur en soluté initiale dans l'extrait et qui correspond à la quantité de soluté, se trouvant à la surface du solide et éliminée par convection

Les teneurs en chaque soluté extrait sont exprimées en mg/g MS

La teneur initiale en soluté est obtenue par extrapolation de la première partie de la courbe d'évolution de $Y=f(t)$, vers $t \rightarrow 0^+$.

En dernier lieu, et à la lumière des résultats expérimentaux, nous avons pu, d'une façon pratique, retenir une teneur finale Y_{∞} en extrait correspondant au « palier » obtenu au bout des 4 heures d'extraction dans le cas des oligosaccharides à partir des graines de *Tephrosia purpurea* et 10 minutes dans le cas des anthocyanes de La Roselle ; l'extraction pourrait alors être considérée pratiquement complète

Le tracé de la courbe de $\ln R$ en fonction de t , permet de donner, par l'intermédiaire de la pente, les valeurs de k selon l'équation :

$$\text{Équation II-10 :} \quad \ln \frac{Y_{\infty} - Y}{Y_{\infty} - Y_0} = \ln A - kt$$

II-2.6. TESTS BIOLOGIQUES

II-2.6.a. CULTURE CELLULAIRE

Un type particulier de lignée cellulaire est utilisé : il s'agit de kératinocytes issus d'explants humains, immortalisés in vitro (cellules déficientes en p53). Cette lignée nous permet une meilleure reproductibilité et un gain de temps du fait de son fort turn-over. Elle nous permet également d'avoir un grand nombre de cellules, paramètre non

négligeable sachant la quantité de cellules nécessaire pour certaines manipulations au laboratoire.

Le protocole de culture de cette lignée cellulaire est le suivant (manipulation sous hotte pour être en condition stérile) :

✚ Décongélation d'un tube de cellules conservé dans de l'azote liquide.

✚ Reprise du contenu du tube.

Il s'agit de reprendre dans 10 ml de milieu de culture pour kératinocytes. Des compléments, les facteurs de croissance EGF et BPE, sont ajoutés (milieu de culture KSFM-C, référence : GIBCO invitrogen 37000-015 +17005-034). Afin d'éviter d'éventuelles contaminations, les antibiotiques pénicilline et streptomycine, 40 U/ml et 40 µg/ml respectivement, sont également ajoutés : cela forme le milieu utilisé pour toutes les étapes de culture cellulaire. Puis l'ajout de 10% de SVF (apport nutritionnel) termine la procédure, avant de laisser la flasque à 37 °C.

✚ Repiquage (ou passage) des cellules lorsqu'elles sont confluentes.

Après aspiration du milieu, un lavage de la flasque avec 3 ml de PBS-EDTA est effectué, puis une nouvelle aspiration permet d'ajouter 3 ml de trypsine-EDTA (l'enzyme hydrolyse les protéines de liaison et décolle le tapis cellulaire). L'aspiration de la trypsine est suivie par la mise à l'étuve de la flasque pendant 3 minutes environ, puis la reprise des cellules se fait dans 10 ml de milieu. Il s'agit ensuite de diviser en 2 flasques contenant 10 ml de milieu KSFM-C + 5% SVF pour conserver un stock de cellules à l'étuve ou alors de compter les kératinocytes sur cellule de Thoma pour l'ensemencement de microplaques.

II-2.6.b. TEST DE CYTOXICITE (XTT).

II-2.6.b.i. Principe

L'objectif de ce test est de mesurer la limite de toxicité d'un échantillon. Le réactif XTT ou sel de Tétrazolium est transformé en Formazan par les déshydrogénases localisées dans les chaînes respiratoires mitochondriales. Ainsi, seules les cellules vivantes sont capables de produire le formozan, composé orange détecté à 450 nm.

II-2.6.b.ii. Protocole

Le jour 1 : ensemencement de microplaques 96 puits, à raison de 7500 cellules et 200 µl de milieu de culture KSFM-C par puits (sous hotte). Réaliser également sur une microplaque, une gamme de dilution de raison 2 de l'échantillon à 50 mg/ml, soit une gamme allant de 50 mg/ml à 0.195 mg/ml.

Le jour 2 : traitement des cellules pour 48 heures dans des conditions stériles. Un échantillon par plaque est testé : chaque dilution préalablement préparée est diluée au 1000^{ème} dans du milieu KSFM-C (pour limiter la quantité de solvant au 1%) puis est testée en 6 points (une colonne), en comparaison d'une colonne témoin, le solvant de solubilisation (le plus souvent le DMSO). Les bords des plaques ne contiennent que de l'eau afin de limiter un effet de bord.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Eau	Eau	Eau	Eau	Eau	Eau	Eau	Eau	Eau	Eau	Eau	Eau
B	Eau	solvant	P50	P25	P12.5	P6.25	P3.125	P1.56	P0.78	P0.39	P0.195	Eau
C	Eau	solvant	P50	P25	P12.5	P6.25	P3.125	P1.56	P0.78	P0.39	P0.195	Eau
D	Eau	solvant	P50	P25	P12.5	P6.25	P3.125	P1.56	P0.78	P0.39	P0.195	Eau
E	Eau	solvant	P50	P25	P12.5	P6.25	P3.125	P1.56	P0.78	P0.39	P0.195	Eau

F	Eau	solvant	P50	P25	P12.5	P6.25	P3.125	P1.56	P0.78	P0.39	P0.195	Eau
G	Eau	solvant	P50	P25	P12.5	P6.25	P3.125	P1.56	P0.78	P0.39	P0.195	Eau
H	Eau	Eau	Eau	Eau	Eau	Eau	Eau	Eau	Eau	Eau	Eau	Eau

Figure II-5 : schéma d'une microplaque 96 puits pour le test XTT

Solvant : témoin.

P50 : l'échantillon à 50µg/ml, 6 points par dose.

Le jour 4 : test XTT : remplacement du milieu de chaque puits (sous hotte) par 100 µl de réactif XTT dilué au 1/5^{ème} dans le milieu KSFM-C (selon protocole préalablement établi), incubation 3 heures à l'étuve puis lecture à 450 nm.

II-2.6.c. DOSAGE DES PROTEINES TOTALES : TEST BCA

La réalisation du test BCA est d'une part corrélée avec le test XTT afin de pouvoir confirmer les données préalablement fournies et d'autre part, de doser les protéines totales.

II-2.6.c.i. Principe

Il s'agit d'un test colorimétrique (Référence BC Assay Kit, Uptima Interchim), consistant en une réduction des ions Cu^{2+} en Cu^+ par des liaisons peptidiques des protéines. L'acide bicinchoninique chélate les ions Cu^+ d'une manière très spécifique, formant un complexe soluble coloré en violet : la réaction est mesurée par l'absorbance du complexe Cu^+ final à 570 nm, absorbance directement proportionnelle à la concentration protéique.

II-2.6.c.ii. Protocole

Une fois le test XTT réalisé sur les microplaques, les puits sont lavés au PBS avant la congélation des plaques, qui permet de faire éclater les cellules et donc de libérer les protéines. Le protocole du test BCA est le suivant : ajout de 200 µl de réactif (A+B 50 :1) par puits, puis incubation pendant 30 minutes à l'étuve à 37 °C sous agitation douce, afin de pouvoir lire l'absorbance à 570 nm.

II-2.6.d. DOSAGE DES AMPc

II-2.6.d.i. Culture

Les cellules utilisées sont des pré-adipocytes humains normaux.

Les cellules confluentes dans un premier temps, cessent de se diviser pour entrer dans leur phase de différenciation précoce. Cette différenciation conduit à la formation de colonies de cellules qui subissent la conversion adipocytaire.

Cette différenciation s'accompagne de changements dans la biosynthèse de plusieurs protéines et d'une augmentation d'activités enzymatiques différentes dont la glycéro-3-phosphate déshydrogénase dénommée G3PDH et de la synthèse d'AMPc.

Il est rappelé que la G3PDH permet la formation du glycérol 3 phosphate, molécule impliquée par la suite dans la néo-synthèse des lipides intracellulaires (triglycérides). Ainsi, une augmentation de l'activité de la G3PDH est directement liée au renforcement de cette synthèse. D'autre part, une augmentation de l'AMPc, molécule énergétique, va contribuer à la lipolyse. Cette augmentation se fait par l'activation de l'Adénylate cyclase.

Il a été démontré qu'un extrait de *Tephrosia purpurea* était capable in vitro d'activer cette enzyme, activité confirmée sur culture de cellules.

II-2.6.d.ii. Protocole

Les pré-adipocytes sontensemencés au fond de micro plaques de culture 12 puits avec du milieu « Preadipocyte Growth Medium » (PGM) jusqu'à confluence. Durant la phase de différenciation, les cellules sont cultivées en présence de milieu (PGM) complétementé par de l'insuline bovine (0.5µg/ml), de la Dexamethasone (400 ng/ml) et de l'IBMX (44µg/ml).

Pendant la phase de traitement par les échantillons, on utilise le milieu Adipocyte Nutrition Medium qui ne contient plus d'insuline mais 3% de SVF.

Les échantillons sont testés en triplicates à la concentration finale de 50µg/ml.

Les opérations de culture se déroulent de la manière suivante :

- | | |
|-------------------|---|
| Au jour J=0 : | ensemencement à raison de 5000 cellules / cm ² dans du milieu (PGM). |
| A J=2 et J=4 : | changement de milieu. |
| A J=6 : | mettre en culture avec du milieu (PGM) pour 3 jours. |
| ADe J=9 à J= 18 : | mettre en culture avec du milieu Adipocyte Nutrition Medium. |
| A J= 18 : | remplacer le milieu par du milieu Adipocyte Nutrition Medium contenant 50µg/ml de l'échantillon à tester. |
| A J=, 19 : | Renouveler le traitement 24 heures plus tard. |
| A J=20 ou 21 : | Après 24 et 48 heures de traitement, récupération du milieu de culture pour dosage de l'AMPc et congélation du tapis cellulaire pour un dosage ultérieur des protéines. |

L'AMPc est dosé grâce au kit de dosage Abcys (réf N403110) et les protéines par la technique BCA (ref UP40840 A de chez Interchim).

II-2.7. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE

Nous avons effectué l'observation de microstructure en utilisant un microscope électronique à balayage (MEB), type de JEOL 5410LV au centre commun d'analyses (CCA), de l'Université de La Rochelle. Les échantillons sont placés sur un stand couvert par le carbone adhésif, sous un vide partiel avec une accélération de tension de 20 kV.

CHAPITRE II-3.

APPROCHE STATISTIQUE

II-3.1. MÉTHODOLOGIE DES PLANS D'EXPERIENCES

Les expériences en laboratoire ou en contexte industriel concernent généralement l'étude de l'influence de nombreux paramètres sur le résultat d'un phénomène ou d'un procédé. Pendant longtemps, la procédure expérimentale a consisté à faire varier un facteur à la fois, en maintenant fixes tous les autres facteurs. L'utilisation des plans d'expériences ou plusieurs facteurs varient simultanément a permis d'alléger l'expérimentation, en terme de temps et de coût, tout en permettant l'étude des interactions entre facteurs et en augmentant la précision des estimations des effets. Ainsi, les plans d'expériences sont devenus des outils indispensables, et leur adaptation à des situations expérimentales variées, a entraîné leur développement et leur diversité.

Les plans d'expériences ont un réel intérêt dans l'étude des phénomènes en vue d'aboutir à des lois de type empirique ; leur impact dans l'optimisation des procédés est direct. Les études ainsi réalisées par plan d'expériences permettent de mieux généraliser les résultats expérimentaux et d'aboutir à une meilleure compréhension des Phénomènes physiques des nouveaux procédés.

Plusieurs types de plans d'expériences sont proposés en fonction des objectifs et la situation. Par exemple:

- ✚ Pour une étude exploratoire dont l'objectif principal est de sélectionner les facteurs les plus influents, un plan factoriel fractionnaire est bien adapté.
- ✚ Lorsque l'ensemble des expériences prévues ne peut être réalisé dans des conditions homogènes, le plan factoriel est réparti en groupes homogènes appelés blocs.
- ✚ Pour affiner l'étude de facteurs décelés influents et modéliser plus précisément leur relation avec la réponse étudiée (qualité, performance), un plan pour surface de réponse peut être utilisé.

Dans cette étude, notre objectif, après avoir défini les paramètres les plus influents, est de cerner, au moindre coût d'expérimentation, le domaine d'exploitation des paramètres. C'est pour cette raison, qu'on a opté pour la méthode de plan composite centré.

Les plans composites centrés ont été proposés pour la première fois par (Box, Hunter et al. 1951). Ils sont construits à partir des plans factoriels complets ou fractionnaires et permettent d'estimer efficacement un modèle du 2nd degré en assignant aux facteurs plus de 2 niveaux. Dans un plan composite centré, on a ajouré des essais au centre et à l'extérieur du domaine. La figure représente les essais de plans composites centrés à 2 et 3 facteurs.

Un plan composite centré se compose de trois parties principales :

- ✚ Un plan factoriel complet à deux niveaux (-1) et (+1). Ce plan permet de retrouver comme points expérimentaux toutes les combinaisons possibles de deux niveaux choisis des k facteurs, soit 2^k points. L'utilisation du plan factoriel complet se limite à l'étude de l'effet des paramètres selon un modèle linéaire.
- ✚ Des répétitions au point central (niveau 0) en vue d'estimer la reproductibilité des expériences. Nous avons adopté une répétition de 3 fois dans le cas d'un

plan à deux paramètres opératoires, et une répétition de 8 fois dans le cas d'un plan à trois paramètres.

✚ Des points axiaux : Ils complètent les points factoriels en permettant de définir les effets quadratiques des facteurs. Cette approche permet d'ajuster l'allure de variation de la variable réponse en fonction des paramètres opératoires à l'intérieur du domaine. Ces points représentent deux essais par paramètre opératoire retenu et sont situés sur les axes de chaque variable à une distance α de part et d'autre du centre. La valeur de α est fixée par la méthode statistique selon le nombre de paramètres expérimentaux k $\alpha = \sqrt[4]{2^k}$. Donc, pour un nombre de paramètres opératoires $k=2$, $\alpha=1,4142$, alors que pour un nombre de paramètres opératoires $k=3$, $\alpha=1,6818$.

Nous introduisons ainsi cinq niveaux de variation pour chaque paramètre ($-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$). Le nombre total d'expériences est donné par l'expression suivante : $n=2^k+n_0+2k$, k étant le nombre de paramètres opératoires retenus comme variables.

Dans le cas de plan central composite à deux variables à cinq niveaux, le nombre de points expérimentaux est: $2^2 + 2 \times 2 + 3 = 11$.

Dans le cas de plan central composite à trois variables à cinq niveaux, le nombre de points expérimentaux est: $2^3 + 2 \times 3 + 8 = 22$.

II-3.2. ANALYSES STATISTIQUES

Le traitement des résultats est réalisé à l'aide du logiciel STATGRAPHICS Plus (MANUGISTICS Inc., Rockville, Etats-Unis). Le logiciel permet l'interprétation des résultats obtenus dans le domaine multidimensionnel avec un modèle polynomial d'ordre 1 ou 2 à plusieurs facteurs:

Équation II-11 :

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i x_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{\substack{j=2 \\ j>i}}^n \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

Où,.

Y est la variable réponse mesurée,

β_i sont les coefficients de régression,

X_i sont les facteurs (variables opératoires),

ε est l'erreur aléatoire,

n est le nombre de facteurs

i et j sont les indices des facteurs.

Le logiciel de calculs statistiques permet d'effectuer différentes opérations fondées sur l'analyse de la variance. L'analyse de la variance permet d'évaluer si les valeurs obtenues pour une variable quantitative donnée sont significativement différentes. L'analyse de la variance consiste à tester une hypothèse nulle (les moyennes sont égales entre elles) contre l'hypothèse alternative (au moins une moyenne différente). Le principe est alors de comparer la variance de diverses répétitions d'un échantillon à la variance des moyennes entre tous les échantillons. Le rapport entre ces deux variances est appelé F . cette valeur est comparée à une table permettant l'acceptation ou le rejet de l'hypothèse nulle. Ainsi différents groupes ayant des moyennes statistiquement égales

peuvent être définis. Ces groupes sont représentés dans les tableaux par des croix alignées verticalement.

Un test de significativité des effets linéaires, quadratiques de chaque paramètre et des interactions est réalisé et représenté par le diagramme de Pareto. L'adéquation du modèle par rapport aux mesures expérimentales est exprimée par un coefficient de détermination R^2 . Plus ce coefficient est proche de 1, plus le modèle est adapté. Enfin, les représentations graphiques de cette équation sont réalisées sous forme de surfaces de réponse.

II-3.3. PLAN D'EXPERIENCES DANS LE TRAITEMENT DIC

Afin d'analyser l'impact des paramètres opératoires de la DIC et de les optimiser en termes des paramètres de réponse adéquats, nous avons procédé à une étude systématique de l'ensemble des paramètres opératoires. Nous avons, dans le cas des graines broyées de *Tephrosia purpurea*, retenu et privilégié trois paramètres opératoires :

- ✚ P : la pression absolue de vapeur d'eau dans la chambre de traitement,
- ✚ t : le temps de traitement,
- ✚ W : la teneur en eau de l'échantillon avant traitement.

Dans le cas des calices de Roselle, à cause de la difficulté de réhumidification sur ce type de produit (perte de la couleur rouge donc des anthocyanes lors de la réhumidification, structure compacte par le séchage dont la réhumidification n'aurait qu'un effet de surface), un plan à deux paramètres opératoires a été retenu :

- ✚ P : la pression absolue de vapeur d'eau dans la chambre de traitement,
- ✚ t : le temps de traitement.

Les facteurs de réponse qu'on a étudiés pour optimiser ces paramètres sont :

- ✓ La quantité maximale extraite (mg/g de MS) de cicérol et stachyose à partir des graines de *Tephrosia purpurea*
- ✓ Les anthocyanes monomériques totaux (AMT) (mg/g de MS) ainsi que la quantité maximale de chaque anthocyane individuel (mg/g de MS) à partir des calices de Roselle.

Les divers plans d'expériences réalisés dans chacun des cas étudiés sont les suivants :

II-3.3.a. LES GRAINES DE *TEPHROSIA PURPUREA*

1^{er} plan d'expériences à trois paramètres P, W et t :

Points	P : Pression de vapeur d'eau (*10 ⁵ Pa)	W : Teneur en eau (%MS)	t : Temps (s)
+ α	2.8	15	73
- α	5.2	30	197
Point central 0	4	22	135
+1	2	10	30
-1	6	35	240

2^{ème} plan d'expériences à deux paramètres P et t :

Points	P : Pression de vapeur d'eau (*10 ⁵ Pa)	t : Temps (s)
+ α	7	98
- α	4	42

Point central 0	5.5	70
+1	4.4	50
-1	6.6	90

3^{ème} plan d'expériences :

Points	P : Pression de vapeur d'eau (*10 ⁵ Pa)	t : Temps (s)
+ α	6	240
- α	2	30
Point central 0	4	135
+1	2.6	61
-1	5.4	209

II-3.3.b. LES CALICES DE ROSELLE

II-3.3.b.i. Variété de Malaisie

Points	Pression de vapeur d'eau (*10 ⁵ Pa)	Temps (s)
+ α	2	30
- α	0.7	5
Point central 0	1.4	18
+1	1.8	26
-1	0.9	9

II-3.3.b.ii. Variété d'Egypte

Points	Pression de vapeur d'eau (*10 ⁵ Pa)	Temps (s)
+ α	4	60
- α	1	5
Point central 0	2.5	33
+1	3.6	52
-1	1.4	13

PARTIE III

RESULTATS ET DISCUSSIONS

L'objectif de cette partie de travail est d'étudier l'effet des paramètres opératoires de la DIC, plus particulièrement trois paramètres principaux, à savoir la pression de vapeur, le temps de traitement thermique et la teneur initiale en eau du produit à traiter. La méthodologie des plans d'expériences que nous avons adoptée nous a permis de quantifier, grâce au logiciel STATGRAPHICS, l'effet des paramètres opératoires étudiés.

Cette partie comporte Six chapitres, dont quatre traitent de l'impact de la DIC sur l'extraction des oligosaccharides à partir des graines de *Tephrosia purpurea*. Les deux autres analysent l'effet des paramètres opératoires de la DIC sur l'extraction des anthocyanes de la Roselle de Malaisie et d'Egypte.

CHAPITRE III-1.

EFFET DE LA TEXTURATION PAR DIC SUR L'EXTRACTION DES OLIGOSACCHARIDES DE *TEPHROSIA PURPUREA*

III-1.1. RESUME DE L'ARTICLE

L'objectif de cette étude est de déterminer l'impact de la Détente Instantanée Contrôlée (DIC) sur l'extraction des oligosaccharides à partir des graines de *Tephrosia purpurea*. On s'intéresse plus particulièrement à l'effet des trois principaux paramètres opératoires de la DIC : la pression de vapeur dans la chambre de traitement (traduisant d'une certaine façon le niveau thermique du traitement), la teneur initiale en eau des graines et le temps de traitement thermique. Les paramètres de réponse que nous avons tout particulièrement considérés dans notre cas sont la cinétique et le rendement d'extraction.

Le traitement des graines broyées de *Tephrosia purpurea* ayant été ainsi réalisé selon un plan d'expériences à trois paramètres, donne lieu à 22 points expérimentaux avec 8 répétitions au centre. L'étude du rendement et de la cinétique d'extraction par solvant, réalisée pour des durées allant de 15 min à 4h, a permis d'établir une analyse comparative de l'opération effectuée sur des graines broyées de *Tephrosia* différemment traitées par DIC et sur de la matière première (graines broyées non traitées). Nous constatons ainsi que le traitement DIC induit pour les deux marqueurs d'oligosaccharides considérés, une amélioration de l'opération sur les deux plans de la cinétique et de la quantité totale extraite. Le taux d'amélioration dépend des conditions opératoires du traitement DIC.

Pour chacun des deux marqueurs, les produits traités par DIC permettent d'extraire en une heure la même quantité que, généralement on ne peut extraire qu'au bout de quatre heures avec la matière première non prétraitée. En vue de mieux mettre en évidence l'aspect comparatif de notre étude, nous avons défini un « taux d'amélioration de l'extraction totale » en tant que principal paramètre de réponse. Ce paramètre, traduisant la quantité maximale de sucre extraite à partir de graines traitées par DIC rapportée à celle extraite à partir de la matière non prétraitées (Y/Y_i), sera le principal paramètre de réponse utilisé pour quantifier l'effet des différents paramètres de la DIC sur le rendement d'extraction.

Nous avons remarqué que, quel que soit le marqueur considéré, l'amélioration du rendement générée par le prétraitement DIC, peut atteindre 150 % pour le cicéritol et 173 % pour le stachyose). Le maximum de ce taux (Y/Y_i) c'est-à-dire le maximum de rendement total est obtenu pour les mêmes conditions opératoires (à savoir $P = 0,52$ MPa ; $W = 15\%$ et $t = 197$ s) pour les deux marqueurs considérés.

Concernant les paramètres opératoires, dans le domaine de variation choisi et pour un seuil de signification de 5%, les effets simple et quadratique de la pression de vapeur, et les effets d'interaction entre pression - humidité et pression - temps de traitement sont significatifs. De plus, dans ce même domaine de variation des paramètres opératoires, ce sont les effets d'interaction entre pression et temps de traitement thermique et les effets simple et quadratique de la pression qui sont les plus significatifs.

Avec l'augmentation de la pression augmente le rendement maximum en cicéritol et en stachyose. Ce sont principalement la pression et la teneur initiale en eau qui ont une influence positive sur le rendement total de ces deux oligosaccharides. L'absence d'effet significatif du temps de traitement sur l'extraction des deux oligosaccharides montre bien

que le principal effet de la DIC est alors de type mécanique et structurel, étroitement lié à la détente (et à son caractère d'instantanéité).

Des observations en Microscopie Electronique à Balayage (MEB) ont confirmé cette hypothèse et montré une modification de la structure des graines après traitement par DIC ; la modification structurale a un impact direct (positif) sur la cinétique et le rendement d'extraction.

Impact of texturing by DIC on solvent extraction of oligosaccharides from *Tephrosia purpurea*

BEN AMOR B., ALLAF K.

University of La Rochelle -Pole science and Technology, «Laboratory Mastering Technologies for Agro-Industry LMTAI EA 3166»,
avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, FRANCE

III-1.2. ABSTRACT

We investigate in this paper the impact of the Instant Controlled Pressure – Drop DIC treatment on the process of extraction of oligosaccharides from *Tephrosia purpurea* seeds. We quantified the influence of the different DIC operative parameters in order to optimize the treatment in terms of steam pressure ($P= 0.52$ MPa), initial water content ($W= 15\%$) and thermal treatment time ($t=, 197$ s). By applying DIC treatment in these conditions, we got an intensification of the classic process of extraction in both aspects of yield and kinetics. The scanning electron microscopy (SEM) micrographs provided evidence modifications of structure of seeds due to the DIC treatment.

Keywords: extraction, DIC, oligosaccharides, ciceritol, stachyose, SEM

III-1.3. INTRODUCTION

Tephrosia purpurea L. (*Leguminosae*), commonly known in Sanskrit as Sharapunkha, is a copiously branched, sub-erect, herbaceous perennial which occurs throughout the Indian subcontinent. In the Ayurvedic system of medicine, the whole plant has been used to cure tumours, ulcers, leprosy, allergic and inflammatory conditions such as rheumatism, asthma and bronchitis (Rahman, Kashfudduja et al. 1985; Saleem, Ahmed et al. 2001; Damre, Gokhale et al. 2003). Phytochemical investigations on *T. purpurea* have revealed the presence of glycosides, rotenoids, isoflavones, flavanones, chalcones, flavanols, flavones and sterols (Joshi, Shrivastava et al. 1979; Bhatnagar and Kapoor 2000).

Tephrosia purpurea extract, a patented plant active (André, Darnault et al. 1995), was found to stimulate the synthesis of beta-endorphin by keratinocytes. It was shown that stachyose and ciceritol are the two main oligosaccharides involved in this activity.

Generally, one identifies multiple steps in the extraction kinetics. However, systematically, the main part of the operation is limited by diffusion, because of the natural structure of the plant which opposes a resistance to the solvent penetration. The diffusion phenomenon leads to a very slow process. Similar considerations are observed even when solvent is a supercritical fluid. These observations lead us to apply, before solvent extraction, a swelling operation using the well-known process of “Instantaneous Controlled Pressure Drop” DIC (Détente Instantanée Contrôlée) which has been developed in our laboratory (Allaf and Vidal 1989; Allaf, Louka et al. 1994).

The aim of this work is to study the impact of DIC treatment on the oligosaccharides (stachyose & ciceritol) extraction, from the seeds of the Indian *Tephrosia purpurea* plant.

III-1.4. EXPERIMENTAL PROTOCOL

III-1.4.a. RAW MATERIALS

We got crushed seeds from LVMH Recherche (Saint Jean de Braye, France). Crushed seeds with diameter >200 μm were obtained by sieving the seeds with a vertical shaker.

The separation was carried out by shaking approximately 100 g of seeds at amplitude 1 for 7 min.

III-1.4.b. CHEMICALS AND STANDARDS

Deionised water used for the extraction was prepared with a GFL Deioniser (Germany). Ethanol used for extraction was purchased from Carlo Erba. Acetonitrile and water were of HPLC grade. Sucrose was obtained from Sigma (St Louis, USA).

III-1.4.c. MEASUREMENT OF MOISTURE CONTENT

The moisture content of the samples was done using the oven-dry method. 2g of each sample was placed in a glass and was dried for 24 hours at 105°C. The initial water content of the crushed dried seeds was 10 % DB (Dry Basis).

III-1.4.d. DIC PROCESS

III-1.4.d.i. Experimental set up

The experimental set up was largely described (Allaf et al., 1998; (Louka and Allaf 2004). It is composed of three main elements (Figure III-1):

- ✚ The processing vessel (1) where we place and treat the samples,
- ✚ The vacuum system, which consists mainly of a vacuum tank (2) with a volume 130 times greater than the processing reactor, and an adequate vacuum pump. The initial vacuum level was maintained at 50 kPa in all the experiments.
- ✚ A pneumatic valve (3) that assures an “instant” connection between the vacuum tank and the processing vessel; it can be opened in less than 0.2 second; this ensures the abrupt pressure drop within the reactor.

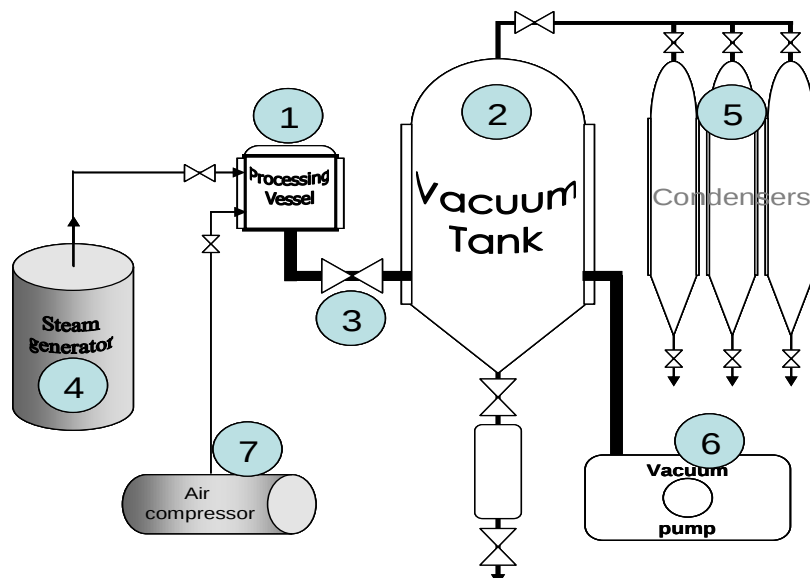


Figure III-1: Schematic diagram of the DIC reactor. 1: Processing vessel; 2: Vacuum tank; 3: Quick motion valve; 4: Steam generator; 5: condensers 6: Vacuum pump; 7: Air compressor.

III-1.4.d.ii. DIC treatment

Dried seeds of *Tephrosia purpurea* are firstly placed in the DIC treatment vessel; then we establish a first vacuum stage in this vessel in order to reduce the resistance towards the steam diffusion as heating fluid through the plant material and consequently improve heat transfer. After closing the pneumatic valve of vacuum, we injected steam under

pressure in the reactor and maintained it for the treatment time. The thermal treatment is followed by an abrupt pressure drop towards vacuum. The resulting autovaporization induces an “instant” cooling of the treated material. After the treatment, *Tephrosia purpurea* seeds were recovered and ready for extraction.

III-1.4.e. EXPERIMENTAL DESIGN

Some preliminary experiments we carried out during the first stage of our work allowed us to identify how the various operative parameters are important and to estimate their variation field we would have to study in this extraction process. The main operative parameters seemed to be the steam pressure P, the initial water content W and the thermal treatment time t. For reducing the experimental points needed for carrying out their own effects, we used a 3 variable central composite rotatable experimental design. In this case, this design needs 22 experiments with 8 repetitions for the central point. The experiments were run in random in order to minimize the effects of unexpected variability in the observed responses due to extraneous factors. Table III-1 lists the independent variables and their level.

Table III-1: level of independent variables used in developing experimental data

Level	- α	-1	0	1	α
Processing pressure (MPa)	0.2	0.28	0.4	0.52	0.6
Initial water content (g/100g DM)	10	15	22	30	35
Thermal Treatment time (s)	30	73	135	197	240

α (axial distance) = $\sqrt[4]{N} = \sqrt[4]{2^k}$, k is the number of operative parameters we are using in this experimental design. $N=2^k$ is the number of experiments of the orthogonal factorial design. In the present case, $k=3$, $N=8$ and $\alpha= 1.681$.

The responses we quantified have concerned the yield and the kinetics of solvent extraction process. Values we got were introduced in the analysis design procedure of Statgraphics plus for Windows (1994-4.1 version). Table III-2 shows the factorial design matrix, with real parameters.

In this experimental design, the initial water content (before DIC treatment) in seeds corresponds to the quantity of total water after a spraying rehydration process.

Table III-2: Experimental data of the composite central design

Experiment n°	Processing pressure (MPa)	Initial water content (g/100g DM)	Processing time (s)
1	0.4	22	135
2	0.6	22	135
3	0.4	22	240
4	0.4	22	135
5	0.52	30	197
6	0.4	35	135
7	0.4	22	135
8	0.52	30	73
9	0.52	15	197
10	0.4	22	135
11	0.52	15	73
12	0.28	30	197
13	0.4	22	135
14	0.28	30	73

15	0.28	15	197
16	0.4	22	135
17	0.4	10	135
18	0.2	22	135
19	0.4	22	135
20	0.28	15	73
21	0.4	22	30
22	0.4	22	135

III-1.4.f. EXTRACTION OF OLIGOSACCHARIDES

The extraction was performed with stirring in a batch extractor. The batch extraction system we used in this study was composed of a 250 ml flat bottomed flask with a magnetic stirrer and a bath boiler.

We placed the crushed seeds (10 g) in the flask, to which we added 100 ml of the extraction solvent (ethanol/water: 70/30 (v/v)). The flask, connected to a cooling system, was placed in a water bath at 45°C maintaining the agitation. With intervals of determined times, we syringed 1 ml samples then filtered them at 0.45 µm before quantifying by HPLC. The quantity of each compounds extracted will be expressed in mg/g of Dry Matter (DM) and referred by "Y".

III-1.4.g. HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

III-1.4.g.i. Sample preparation

We prepared a reference standard solution for sucrose in water/ethanol (30/70%) solvent with a concentration ranging between 50 and 1000 ppm. Linear regression analysis of data of peak area versus concentration was carried out. Polynomial equation of second order calibration curve with accuracy of more than 99 % was obtained.

III-1.4.g.ii. HPLC-PDA

We carried out Liquid Chromatography analysis on a 1100 Agilent HPLC system equipped with a quaternary pump, an autosampler and an evaporative light scattering detectors using a 125x4 mm Lichrospher 100 Diol (5µm) column and a security guard column (Merck, Darmstadt, Germany). Compounds were separated by gradient elution using water (solvent A), and HPLC grade acetonitrile (solvent B) according to the following gradient: 0 min, 5% A; 30 min, 50% A followed by a postrun of 5 min. The solvent flow rate was 1ml/min. Detection parameters were mean pressure MP: 7 bars; air pressure P_{air} =0.2 bars; temperature T=43°C. Injection volume was 20µl.

III-1.4.h. SCANNING ELECTRON MICROSCOPY OBSERVATION (SEM)

We observed the ultra structure of the dried DIC *Tephrosia purpurea* seeds thanks to a scanning electron microscopy (SEM) JEOL 5410LV. Measurements were carried out under partial vacuum and at an accelerating voltage of 20 kV, in the "Common Center of Analyses CCA" of the University of La Rochelle.

III-1.5. RESULTS AND DISCUSSION

III-1.5.a. KINETICS OF EXTRACTION

After treating crushed seeds of *Tephrosia purpurea* by DIC, the water content of each treated sample was given (according to the definite protocol 2.3). For identifying the kinetics of extraction of the oligosaccharides, we carried out measurements between 15

min and 4h. Figure III-2 and Figure III-3 present the kinetics of extraction of the two oligosaccharides, namely the ciceritol and stachyose, from crushed seeds of *Tephrosia purpurea*.

It is noticed, for the two sugars, that the extracted quantity increases with time to reach a stage with a maximum of quantity extracted for ciceritol and stachyose of 10.22 and 10.67 mg/g DM respectively.

The comparison between the kinetics of extraction of ciceritol and stachyose from untreated and DIC treated seeds according to experiment 2 (Figure III-2 and Figure III-3) shows that, in both oligosaccharides of ciceritol and stachyose, there is an improvement in the extraction kinetics and yields whatever the DIC treating conditions and the maximum of extraction rate is obtained within a shorter time (1 hour) compared to untreated seeds (about 4 hours).

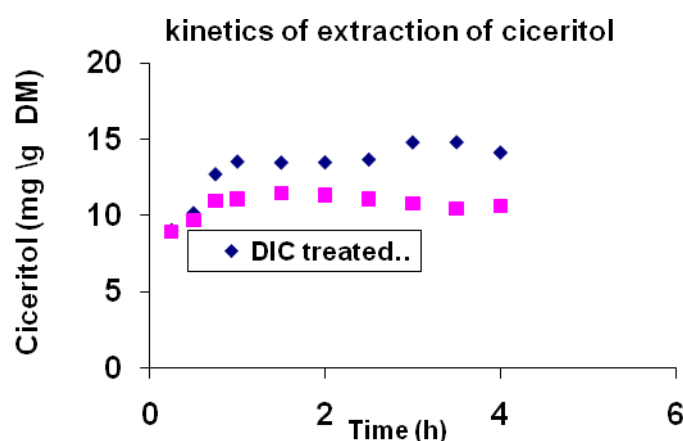


Figure III-2: kinetics of extraction of ciceritol from untreated and DIC treated (run 2) *Tephrosia purpurea* seeds.

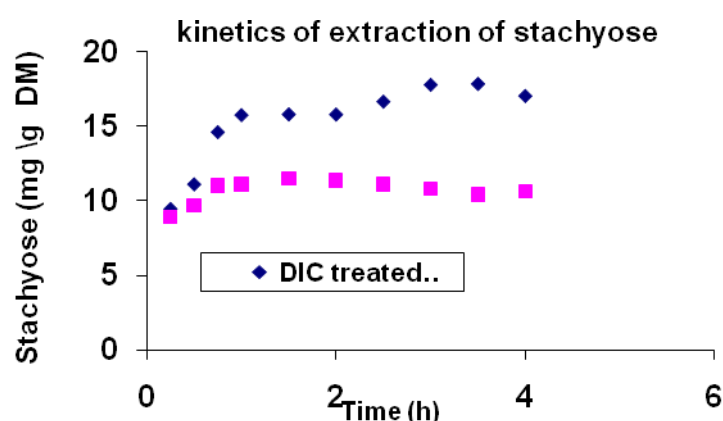


Figure III-3: kinetic of extraction of ciceritol from untreated and DIC treated (run 2) *Tephrosia purpurea* seeds.

III-1.5.b. STATISTICAL RESPONSES

III-1.5.b.i. Yield of extraction

This part of our study aimed to identify, through the experimental design, the impact of the DIC in terms of the extraction yield of ciceritol and stachyose. For better highlighting the comparative aspect of our study, we used the "normalized yield of the total extraction" as a principal response parameter; we defined it as a rate of improvement of the quantity of sugar extracted from seeds treated by DIC reported to that extracted from the untreated seeds (Y/Y_i). The experimental responses are summarized in Table III-3 for both ciceritol and stachyose.

Table III-3: Total extraction amount of Ciceritol and stachyose determined by HPLC.

Exp. n°	Processing steam pressure (MPa)	Initial water content (g/100g DM)	Processing Thermal time (s)	ciceritol		stachyose	
				Y mg/g d.m	Y/Yi	Y mg/g d.m	Y/Yi
1	0.4	22	135	12,88	126%	16,00	150%
2	0.6	22	135	14,13	138%	17,02	160%
3	0.4	22	240	13,56	133%	16,89	158%
4	0.4	22	135	13,02	127%	16,69	156%
5	0.52	30	197	13,25	130%	15,83	148%
6	0.4	35	135	13,75	135%	17,45	164%
7	0.4	22	135	13,75	134%	17,42	163%
8	0.52	30	73	13,84	135%	17,68	166%
9	0.52	15	197	15,36	150%	18,41	173%
10	0.4	22	135	14,13	138%	17,48	164%
11	0.52	15	73	13,70	134%	17,74	166%
12	0.28	30	197	13,59	133%	17,16	161%
13	0.4	22	135	12,93	126%	16,20	152%
14	0.28	30	73	14,22	139%	18,58	174%
15	0.28	15	197	10,90	107%	13,74	129%
16	0.4	22	135	11,90	116%	14,78	139%
17	0.4	10	135	12,21	119%	15,28	143%
18	0.2	22	135	13,30	130%	17,13	161%
19	0.4	22	135	12,86	126%	16,38	154%
20	0.28	15	73	12,38	121%	16,06	151%
21	0.4	22	30	13,41	131%	16,68	156%
22	0.4	22	135	12,81	125%	16,18	152%
MP	-	-	-	10,22	100%	10,67	100%

From Table III-3, one can determine the optimized conditions of DIC treatment for getting the highest yields of stachyose and ciceritol. We can note that, whatever the oligosaccharide considered, the improvement of the yield is very important (up to 150 % for the ciceritol and 173 % for stachyose). The highest values of yield of the total extraction amount are obtained with the same operating conditions (steam pressure $P = 0.52$ MPa; initial water content $W = 15\%$ and thermal treatment time $t = 197$ s) for both ciceritol and stachyose.

III-1.5.b.ii. Impact of DIC parameters on the yield of extraction

ii.a. Statistical analyses

As the dependent variable allowed us to get empirical regression models; the model of the yield of ciceritol is the following:

$$\text{Équation III-1 : } Y(\text{Ciceritol}) = 140.083 - 16.7407 \cdot P + 3.26382 \cdot W - 0.452759 \cdot t + 3.29702 \cdot P^2 - 0.694444 \cdot P \cdot W + 0.0806452 \cdot P \cdot t + 0.00440373 \cdot W^2 - 0.00268817 \cdot W \cdot t + 0.00069816 \cdot t^2$$

For the yield of stachyose, the regression model is:

$$\text{Équation III-2 : } Y(\text{Stachyose}) =, 195.45 - 25.2452 * P + 3.00669 * W - 0.545896 * t + 3.19623 * P^2 - 0.527778 * P * W + 0.114247 * P * t + 0.00502337 * W^2 - 0.00430108 * W * t + 0.000524482 * t^2$$

The regression coefficient R^2 is then equal to 0.87 and 0.83 respectively which means a good fit of a model (Joglekar and May 1987).

ii.b. Effect of DIC parameters

Pareto chart shows that steam pressure has the main effect of DIC parameters for both ciceritol and stachyose extractions (Figure III-4 and Figure III-7). It intervenes through simple and quadratic effects as well as interaction effects with initial water content and thermal processing time. Figure III-5 and Figure III-8 show that the higher the steam pressure, the higher the extraction yields. We observed similar tendencies with the initial water content. However, the thermal treatment time effect was not really important in both cases of ciceritol and stachyose.

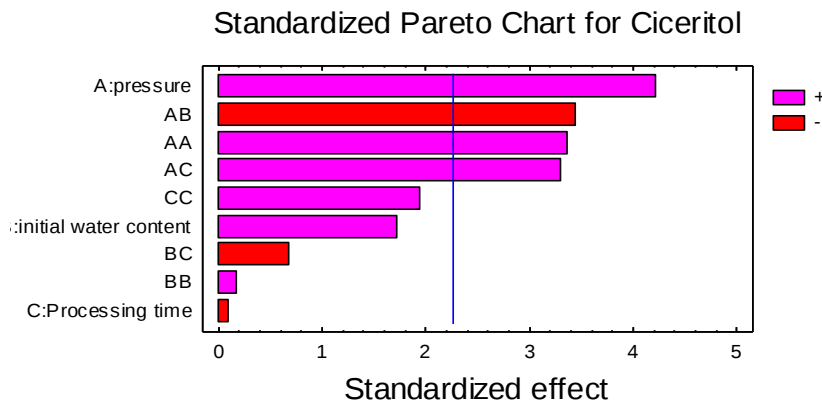


Figure III-4: Effect of DIC treatment on total extraction yields; case of ciceritol

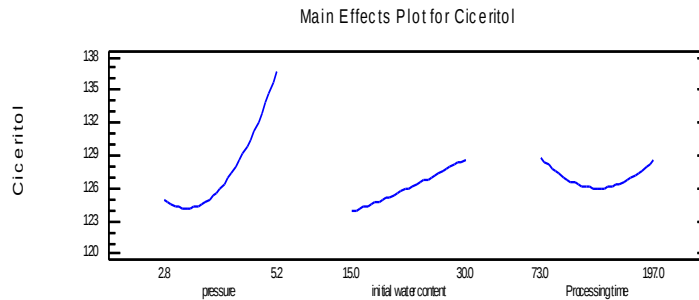


Figure III-5: Main effects of DIC parameters on the yields of ciceritol (%)

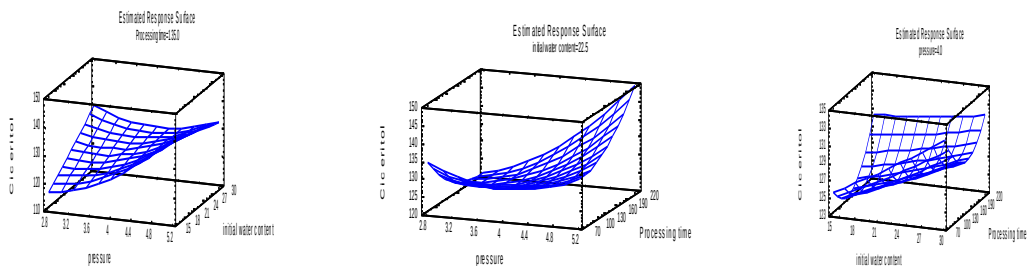


Figure III-6: Response surface in the case of ciceritol

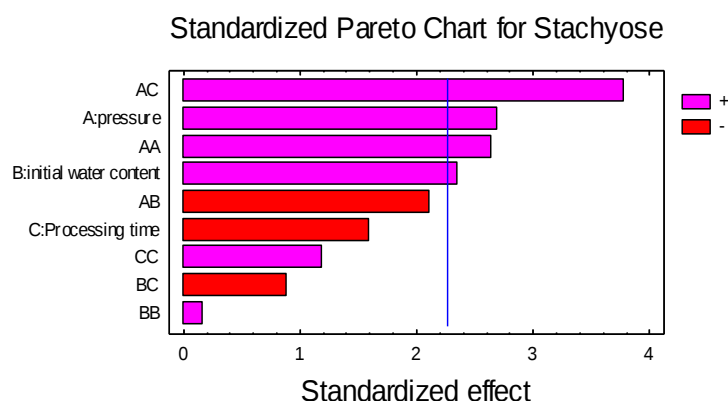


Figure III-7: Effect of DIC treatment on total extraction yields; case of stachyose

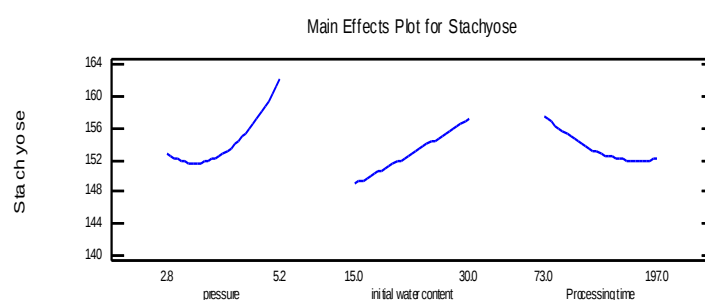


Figure III-8: Main effects of DIC parameters on the yields of stachyose (%)

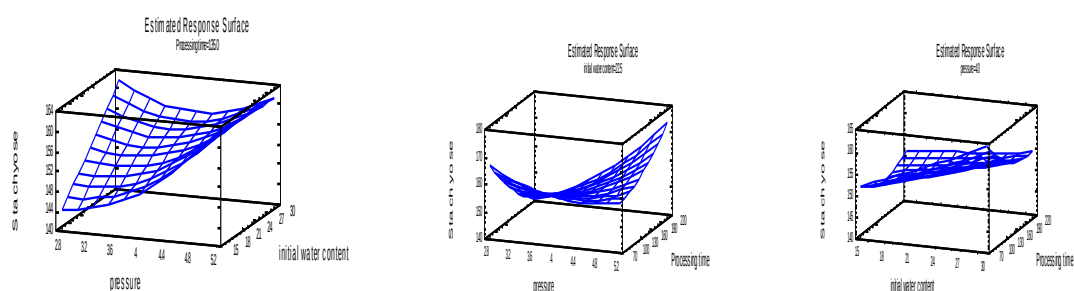


Figure III-9: Response surface in the case of stachyose

Figure III-6 and Figure III-9 show the surface response of the yield of respectively ciceritol and stachyose, versus the operative conditions (Steam pressure P, initial water content W, and time of thermal treatment t). We can notice a very significant impact of P and W and relatively light effect of time of treatment. It must traduce a light thermal effect properly said and an important mechanical impact thanks to the “instant” pressure-drop.

III-1.5.c. RECOVERY

The *Tephrosia purpurea* seeds were treated in triplicates according to the optimum DIC conditions ($P = 0.52$ MPa; $W = 15\%$ and $t = 197$ s) and then extracted following the same plan. The maximum of ciceritol and stachyose quantities extracted were 14.10 ± 0.35 and 17.28 ± 0.43 mg/g DM respectively.

III-1.5.d. SCANNING ELECTRON MICROSCOPY OBSERVATION

In order to study the microstructure changes after the DIC treatment, DIC treated and untreated seeds were observed by SEM. The structural changes are shown in Figure III-10, Figure III-11, and Figure III-12. We note that the external structure of the untreated

seeds is highly more compact with holes smaller than the external structure of DIC treated seeds. These figures showing the great impact of DIC on the microstructure of *Tephrosia purpurea* seeds may easily explain why the extraction is much better after DIC treatment which therefore, has much more mechanical and structural impact than thermal and chemical one.

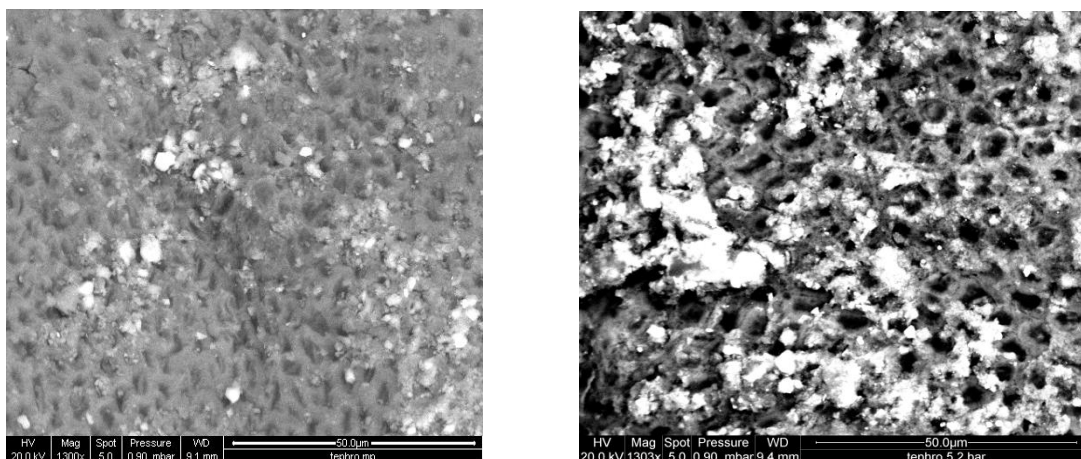


Figure III-10: External microstructure of untreated seeds of *Tephrosia purpurea* (at left) and DIC treated seeds ($P=0.6\text{MPa}$; $t=135$) ($50\text{ }\mu\text{m}$)

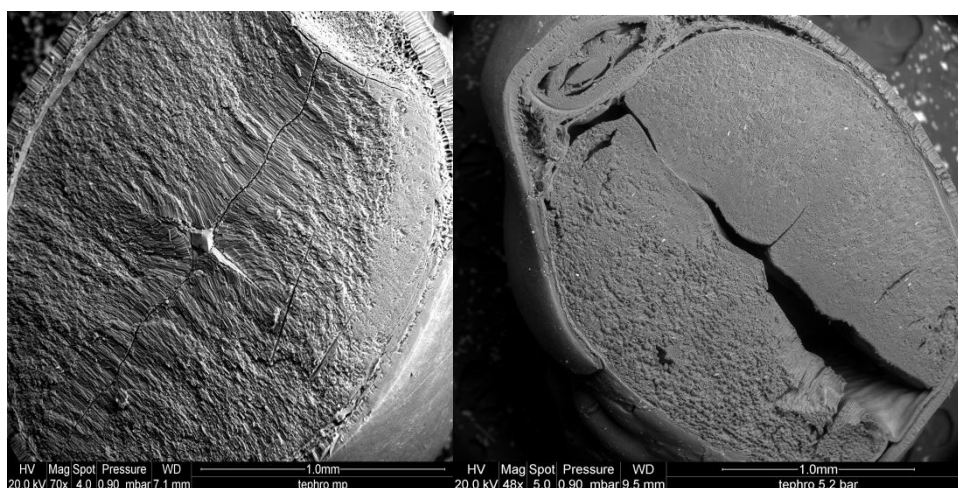


Figure III-11: Microstructure of untreated seeds of *Tephrosia purpurea* (at left) and DIC treated seeds ($P=0.6\text{ MPa}$; $t=135$)

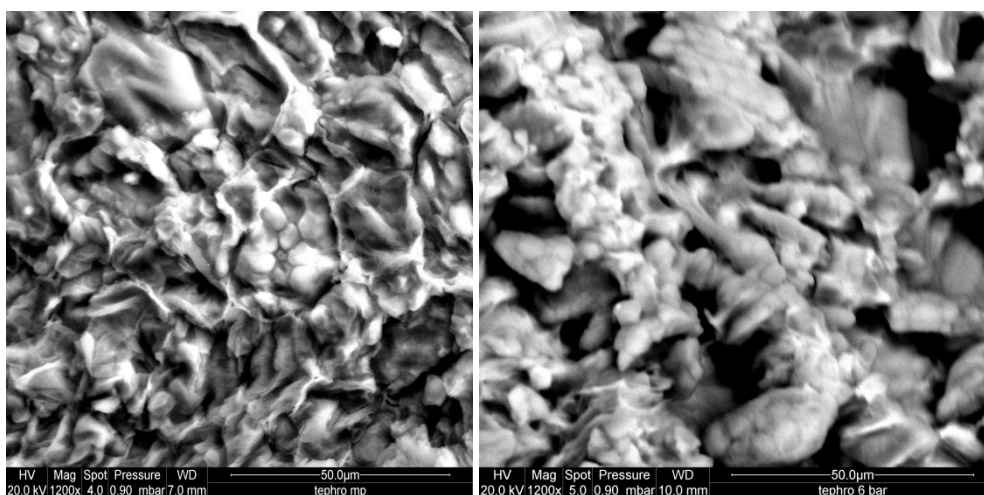


Figure III-12: internal microstructure of untreated seeds of *Tephrosia purpurea* (at left) and DIC treated seeds ($P=0.6\text{ MPa}$; $t=135$) ($50\text{ }\mu\text{m}$)

III-1.6. CONCLUSION

In conclusion, the results we got from the present work have proved that the DIC treatment had a great impact on the kinetics and the yield of extraction of ciceritol and stachyose in the cases of *Tephrosia purpurea* seeds. Between the different combinations of the parameters of DIC, the experiment 9 ($P = 0.52$ MPa; $W = 15\%$ and $t = 197$ s) seems to be the best treatment giving an improvement of 150 and 173% for ciceritol and stachyose respectively. The DIC effect is mainly due to a mechanical – structure modification; no biochemical effect in terms of extracted molecules has been identified.

III-1.7. REFERENCES

- Allaf, K., N. Louka, et al. (1994). French Patent n° 9309720.
- Allaf, K. and P. Vidal (1989). Gradient Activity Report N° CR/89/103, University of Technology of Compiègne.
- André, P., S. Darnault, et al. (1995). Cosmetic or pharmaceutical and particularly dermatological composition containing an extract of *Tephrosia*, particularly *Tephrosia purpurea*. France: 20.
- Bhatnagar, R. and R. C. Kapoor (2000). "Phytochemical investigation of *Tephrosia purpurea* seeds." Indian Journal of Chemistry **39B**: 879-882.
- Damre, A. S., A. B. Gokhale, et al. (2003). "Studies on the immunomodulatory activity of flavonoidal fraction of *Tephrosia purpurea* ." Fitoterapia **74**(3): 257-261.
- Joglekar, A. M. and A. T. May (1987). "Product excellence through design of experiments. ." Cereal Foods World **32**: 857–868.
- Joshi, S. S., R. K. Shrivastava, et al. (1979). "Chemical examination of *Tephrosia purpurea* seeds " J. Indian. Chem. Soc. **56**: 303-305.
- Louka, N. and K. Allaf (2004). "Expansion ratio and color improvement of dried vegetables texturized by a new process "Controlled Sudden Decompression to the vacuum": Application to potatoes, carrots and onions." Journal of Food Engineering **65**(2): 233-243.
- Rahman, H., T. M. Kashfudduja, et al. (1985). "Hypoglycaemic activity of *Tephrosia purpurea* seeds." Indian. J. Med. Res. **81**: 418-421.
- Saleem, M., S.-u. Ahmed, et al. (2001). "*Tephrosia purpurea* alleviates phorbol ester-induced tumor promotion response in murine skin." Pharmacological Research **43**(2): 135-144.

CHAPITRE III-2.

COMPLEMENT D'ESSAIS SUR *TEPHROSIA PURPUREA*

A la suite de l'ensemble de l'étude précédente, nous avons cherché à utiliser les résultats déjà exposés (article 1) et procéder à l'approfondissement de l'analyse de l'effet de la DIC sur l'extraction des oligosaccharides à partir des graines de *Tephrosia purpurea*.

Concernant l'extraction des oligosaccharides à partir des graines de *Tephrosia*, les premiers résultats prometteurs nous ont dirigé à effectuer un nouveau plan d'expériences dont les deux paramètres à étudier seront la pression et le temps de traitement. La teneur initiale d'eau du produit augmente mais pour des temps de traitement thermique plus faibles, ainsi on fera varier la pression entre 0,4 et 0,7 MPa, le temps de traitement entre 50 et 90 s et on fixera la teneur initiale en eau du produit à 30 %.

D'après les résultats de l'article 1, il est évident que l'effet d'extraction par convection (des molécules présentes à la surface) doit avoir une importance spécifique ; il serait alors important de s'intéresser aux premières minutes de la cinétique d'extraction de ces deux marqueurs afin de mieux déterminer l'effet de la DIC sur celle ci.

Les graines broyées de *Tephrosia purpurea* ont été traitées par DIC selon un plan d'expériences dont les paramètres sont les suivants :

Tableau III-4 : paramètres opératoires et limites de variation adoptées dans le plan d'expérience

Niveau	Pression de vapeur (MPa)	Temps de traitement thermique (s)
-1	0,44	50
+1	0,66	90
0	0,55	70
-α	0,4	42
+α	0,7	98

Dans ce plan d'expériences, la teneur initiale en eau a été fixée à 30%. Les graines ont donc subi une ré- humidification par pulvérisation d'eau liquide, suivie d'un certain temps d'homogénéisation. La nouvelle valeur a été vérifiée après ré humidification et stabilisation par mesure à l'étuve.

Les différents points opératoires réalisés sont donnés par le Tableau III-5 suivant :

Tableau III-5: Paramètres opératoires de la DIC

Numéro d'échantillon	Pression de vapeur (MPa)	Temps de traitement thermique (s)
1	0,55	98
2	0,44	50
3	0,44	90
4	0,55	42
5	0,66	50
6	0,55	70
7	0,66	90

8	0,4	70
9	0,55	70
10	0,55	70
11	0,7	70

III-2.1. EFFET DE LA DIC SUR LA CINETIQUE D'EXTRACTION DES OLIGOSACCHARIDES

Après avoir traité les graines broyées de *Tephrosia purpurea* par DIC, la teneur en eau de chaque échantillon traité a été déterminée (selon le protocole défini § II-2.1). Les mesures de la cinétique d'extraction des oligosaccharides ont été réalisées entre 2 min et 4h.

Les Tableau III-6 et Tableau III-7 présentent la quantité extraite de cicérol et de stachyose en fonction du temps d'extraction.

Tableau III-6 : Quantité (mg/g MS) de cicérol extrait à partir des graines de *Tephrosia purpurea* en fonction du temps d'extraction

Temps (min)	Point 1	Point 2	Point 3	Point 4	Point 5	Point 6	Point 7	Point 8	Point 9	Point 10	Point 11	MP
2	5,18	4,459	4,76	-	5,41	5,37	-	4,27	4,29	4,49	4,76	4,45
5	5,73	4,833	5,02	4,81	6,87	5,72	5,04	4,69	4,68	4,88	5,18	4,88
10	6,64	5,781	5,71	5,64	6,57	6,48	5,39	5,51	5,60	5,76	-	5,78
15	7,51	6,958	6,52	6,45	7,23	7,21	6,18	6,46	6,50	6,63	7,50	6,64
30	8,93	8,365	7,86	7,93	8,53	8,29	7,03	8,32	8,24	8,14	8,74	8,12
60	10,12	9,423	11,98	9,19	9,82	9,55	8,41	9,80	9,88	9,70	9,92	9,40
120	10,61	10,045	9,94	10,02	10,70	10,22	9,74	-	10,87	10,51	11,00	10,10
180	10,83	10,184	10,29	10,38	11,03	10,47	10,60	10,71	11,14	10,80	10,92	10,11
240	11,04	10,280	10,45	10,52	11,04	10,58	11,10	10,89	11,42	10,92	11,26	10,09

Tableau III-7 : quantité (mg/g MS) de stachyose extrait à partir des graines de *Tephrosia purpurea* en fonction du temps d'extraction

Temps (min)	Point 1	Point 2	Point 3	Point 4	Point 5	Point 6	Point 7	Point 8	Point 9	Point 10	Point 11	MP
2	5,38	4,52	4,85	-	5,56	5,56	-	4,37	4,37	4,60	4,83	4,72
5	6,08	5,08	5,18	5,01	7,16	5,95	5,15	4,91	4,82	5,06	5,26	5,31
10	7,28	6,54	6,10	6,04	6,94	7,07	5,54	6,19	5,97	6,12	-	6,53
15	8,44	8,21	7,17	7,14	7,86	7,99	6,53	7,58	7,18	7,29	8,22	8,27
30	10,50	10,61	9,22	9,47	9,76	9,75	7,58	10,70	9,66	9,61	9,90	10,28
60	12,70	12,75	15,03	11,70	12,11	11,85	9,50	13,12	12,30	12,09	11,83	10,78
120	13,95	13,83	12,96	13,56	13,57	13,45	11,60	-	14,33	13,86	13,65	11,53
180	14,82	14,10	13,88	14,32	14,46	13,95	13,58	14,93	15,18	14,81	14,20	11,51
240	14,95	14,41	14,25	14,70	14,72	14,53	14,25	15,46	15,60	15,04	14,29	11,06

L'étude de l'extraction a été réalisée sur des graines broyées de *Tephrosia purpurea* traitées par DIC comparativement à la matière première formée de graines broyées non prétraitées par DIC. Elle nous a permis de confirmer ce que nous avons déjà observé lors des premiers travaux sur les graines de *Tephrosia* (article 1), que le traitement par DIC

induit pour les deux marqueurs, une amélioration de l'opération sur les deux plans de la cinétique et de la quantité totale extraite.

Le taux d'amélioration dépend des conditions opératoires du traitement DIC. La modélisation de la cinétique d'extraction doit permettre de traduire cet impact. Cependant, il faudrait noter ici la spécificité de la situation actuelle due au fait que la valeur de la quantité maximale extraite n'est pas constante (extraction complète) en raison du taux de disponibilité des molécules considérées.

Etant donnée que la teneur maximale extractible est variable, la présence d'une quantité X_r inaccessible dans le solide, sera traduite par une valeur de Y_∞ (quantité maximale extraite) variable (selon les conditions DIC adoptées) ; plus est faible la valeur de X_r , plus est importante la valeur de Y_∞ . Les résultats issus de l'ensemble de l'étude obtenus à travers les différents traitements DIC, prouvent que la matière première complètement lessivée, contenait encore une quantité résiduelle auparavant inaccessible. A l'aide de la DIC, cette quantité devient différemment accessible ; la partie résiduelle non accessible varie ainsi (pour le meilleur traitement DIC on suppose $X_r=0$).

Notons ainsi que la normalisation de la quantité extraite par rapport à une quantité totale variable d'un échantillon à l'autre, le coefficient K_{obs} et donc la diffusivité effective (D_{eff}), spécifiques à chacun des deux types de soluté (cicérol et stachyose), ne peuvent traduire que très partiellement, le vrai impact d'amélioration de l'extraction. C'est la raison pour laquelle nous avons cherché à considérer et à insérer d'autres paramètres de réponse, à savoir la quantité d'extraction maximale Y_∞ et la quantité extraite dès le démarrage de l'opération (à $t=0$) par convection.

III-2.1.a. CICERITOL

Les différentes valeurs de K , Y_0 , Y_∞ , concernant l'extraction du cicérol, à partir des différents points traités par DIC et pour la matière première sont reportées dans le tableau suivant :

Tableau III-8 : Etude cinétique de l'extraction du cicérol à partir de graines traitées et non traitées par DIC

Point	Pression (MPa)	Temps	Kobs	Y_0	Y_∞
1	0,55	98	0,032	5,15	11,04
2	0,44	50	0,033	4,31	10,280
3	0,44	90	0,029	4,57	10,45
4	0,55	42	0,026	4,38	10,52
5	0,66	50	0,025	5,10	11,04
6	0,55	70	0,027	5,31	10,58
7	0,66	90	0,014	4,71	11,10
8	0,4	70	0,031	4,04	10,89
9	0,55	70	0,026	4,09	11,42
10	0,55	70	0,028	4,35	10,92
11	0,7	70	0,027	4,65	11,26
MP	-	-	0,036	4,07	10,11

III-2.1.b. STACHYOSE

Les différentes valeurs de K , Y_0 , Y_∞ , concernant l'extraction du stachyose, à partir des différents points traités par DIC et pour la matière première sont reportées dans le tableau suivant :

Tableau III-9 : étude cinétique de l'extraction du stachyose à partir de graines traitées et non traitées par DIC

Point	Pression (MPa)	Temps	Kobs	Y ₀	Y _∞
1	0,55	98	0,025	5,28	14,95
2	0,44	50	0,031	4,238	14,407
3	0,44	90	0,023	4,521	14,25
4	0,55	42	0,021	4,268	14,70
5	0,66	50	0,021	5,3	14,72
6	0,55	70	0,021	5,382	14,53
7	0,66	90	0,011	4,723	14,25
8	0,4	70	0,027	3,902	15,46
9	0,55	70	0,021	4,018	15,60
10	0,55	70	0,022	4,283	15,04
11	0,7	70	0,023	4,617	14,29
MP	-	-	0,041	4,18	13,00

III-2.2. ESTIMATION DE LA DIFFUSIVITE EFFECTIVE

La solution de la deuxième loi de Fick, pour une sphère dans ce cas précis, peut être exprimée par rapport à Y selon l'expression suivante :

$$\text{Equation III-3} \quad \frac{Y_{\infty} - Y}{Y_{\infty} - Y_0} = \sum A_i \exp(-q_i^2 \tau)$$

Avec :

Y_∞ : teneur en soluté dans l'extrait (mg/g MS)

Y₀ : teneur en soluté dans l'extrait à t=0 correspondant à l'extraction de la quantité de soluté se trouvant à la surface du solide (m₀) (mg/g MS)

Y : teneur en soluté dans l'extrait à t (mg/g MS)

En développant cette équation on obtient :

Équation III-4 :

$$\frac{Y_{\infty} - Y}{Y_{\infty} - Y_0} = \frac{6}{\pi^2} \exp\left(-\frac{\pi^2 D_{\text{eff}} t}{d_p^2}\right) + \frac{6}{4\pi^2} \exp\left(-\frac{4\pi^2 D_{\text{eff}} t}{d_p^2}\right) + \frac{6}{9\pi^2} \exp\left(-\frac{9\pi^2 D_{\text{eff}} t}{d_p^2}\right) + \frac{6}{16\pi^2} \exp\left(-\frac{16\pi^2 D_{\text{eff}} t}{d_p^2}\right) + \dots$$

La solution de la deuxième loi de Fick, pour une sphère, et en utilisant le premier terme de la série ($\tau = D_{\text{eff}} * t / d_p^2 > 0,109$), permet d'estimer la diffusivité effective de chaque marqueur. On obtient dans le cas du cicérol :

Tableau III-10 : valeurs de la diffusivité effective du cicérol pour la matière non traitée et différemment traitée par DIC.

Point	Pression de traitement (MPa)	Temps de traitement (s)	Deff *10 ¹² (m2/s)
1	0,55	98	3,94
2	0,44	50	4,07
3	0,44	90	3,57
4	0,55	42	3,20
5	0,66	50	3,08
6	0,55	70	3,33
7	0,66	90	1,73

8	0,4	70	3,82
9	0,55	70	3,20
10	0,55	70	3,45
11	0,7	70	3,33
MP	-	-	4,44

Et dans le cas du stachyose :

Tableau III-11 : valeurs de la diffusivité effective du stachyose pour la matière non traitée et différemment traitée par DIC.

Point	Pression de traitement (MPa)	Temps de traitement (s)	Deff *10 ¹² (m ² /s)
1	0,55	98	3,08
2	0,44	50	3,82
3	0,44	90	2,83
4	0,55	42	2,59
5	0,66	50	2,59
6	0,55	70	2,59
7	0,66	90	1,36
8	0,4	70	3,33
9	0,55	70	2,59
10	0,55	70	2,71
11	0,7	70	2,83
MP	-	-	5,05

On remarque que les valeurs de la diffusivité pour le cicéritol varient entre 1,73 et 4,04*10⁻¹²m².s⁻¹ pour les graines traitées par DIC comparé à 4,44*10⁻¹² m².s⁻¹ pour la matière non traitée.

Pour le stachyose, la diffusivité varie entre 1,36*10⁻¹² et 3,82*10⁻¹² m².s⁻¹ pour les graines traitées par DIC comparé à 5,05*10⁻¹² m².s⁻¹ pour la matière non traitée.

Les valeurs de la diffusivité, pour les deux marqueurs, extraits à partir de produits traités par DIC sont faibles comparées à celles de la matière non traitées par DIC, et ne traduisent pas l'amélioration observée en terme de cinétique. Ceci peut être expliqué par la normalisation des valeurs par rapport à une valeur Y_∞ variable selon les conditions opératoires, ce qui ne permet pas de comparer les différentes situations entre elles.

III-2.3. ESTIMATION DE LA DIFFUSIVITE APPARENTE

D'après le précédent paragraphe, on a remarqué que malgré l'amélioration apportée par la DIC sur le plan de la cinétique et de la quantité maximale extraite, la modélisation adoptée, se basant sur la normalisation par rapport à des valeurs variables d'Y_∞, ne traduit pas l'effet de la DIC. Pour cette raison, on s'est proposé de définir une diffusivité apparente, obtenue en se basant sur une valeur d'Y_∞ fixe commune à tous les points, et qui correspond à Y_∞ obtenu au maximum de l'extraction (conditions optimales de DIC).

Une telle solution empirique (comparable à celle de Crank), appliquée au cas d'une sphère et en se limitant au premier terme de la série ($\tau = D_{\text{eff}} * t / d_p^2 > 0,109$), on obtient, dans le cas du cicéritol :

Point	Pression de traitement (MPa)	Temps de traitement (s)	K _{obs}	Deff *10 ¹² (m ² /s)
1	0,55	98	0,027	3,33

2	0,44	50	0,022	2,71
3	0,44	90	0,023	2,83
4	0,55	42	0,019	2,34
5	0,66	50	0,022	2,71
6	0,55	70	0,02	2,46
7	0,66	90	0,013	1,60
8	0,4	70	0,026	3,20
9	0,55	70	0,026	3,20
10	0,55	70	0,024	2,96
11	0,7	70	0,025	3,08
MP	-	-	0,021	2,59

Et dans le cas du stachyose :

Point	Pression de traitement (MPa)	Temps de traitement (s)	K_{obs}	$Deff * 10^{12} (m^2/s)$
1	0,55	98	0,021	2,59
2	0,44	50	0,023	2,83
3	0,44	90	0,019	2,34
4	0,55	42	0,018	2,22
5	0,66	50	0,018	2,22
6	0,55	70	0,017	2,09
7	0,66	90	0,009	1,11
8	0,4	70	0,026	3,20
9	0,55	70	0,021	2,59
10	0,55	70	0,02	2,46
11	0,7	70	0,018	2,22
MP	-	-	0,019	2,34

III-2.4. EFFET DE LA DIC SUR LE RENDEMENT D'EXTRACTION DES OLIGOSACCHARIDES

En vue de mieux mettre en évidence l'aspect comparatif de notre étude, nous avons fait appel au « taux d'amélioration de l'extraction totale » en tant que principal paramètre de réponse. Ce paramètre, défini en tant que quantité maximale de sucre extraite à partir de graines traitées par DIC rapportée à celle extraite à partir de la matière non traitées (Y_i/Y), sera la réponse utilisée pour déterminer l'effet des différents paramètres de la DIC sur le rendement d'extraction.

Le Tableau III-12 présente le rapport Y_i/Y de cicérol et de stachyose pour les différents points de traitement DIC.

Tableau III-12 : Y_i/Y de cicérol et de stachyose pour les différents points du plan d'expérience

Numéro d'échantillon	Pression (bar)	Temps de traitement (s)	Y_i cicérol (mg/g MS)	Y_i/Y cicérol (%)	Y_i stachyose (mg/g MS)	Y_i/Y stachyose (%)
1	5,5	98	11,04	109	14,95	130
2	4,4	50	10,28	102	14,407	125
3	4,4	90	10,45	104	14,25	124

4	5,5	42	10,52	104	14,7	128
5	6,6	50	11,04	109	14,72	128
6	5,5	70	10,58	105	14,53	126
7	6,6	90	11,1	110	14,25	124
8	4	70	10,89	108	15,46	134
9	5,5	70	11,42	113	15,6	135
10	5,5	70	10,92	108	15,04	130
11	7	70	11,26	112	14,29	124
MP	-	-	10,09	-	11,51	-

D'après le Tableau III-12, on remarque que l'amélioration pour ces essais est moindre que celle observée lors des travaux précédents, de plus l'amélioration est plus marquée dans le cas du stachyose que dans le cas du cicéritol. Ceci pourra être expliqué tout d'abord par la variabilité de la matière première, l'effet du stockage et peut être aussi par l'effet de la réhumidification de la matière à 30 %, qui peut avoir un effet négatif sur le traitement DIC ; il est probable que l'eau entourant les graines à traiter soit évaporée d'une façon privilégiée lors du passage instantané vers le vide ce qui pourrait empêcher l'effet thermo-mécanique d'atteindre efficacement le cœur du grain et réduirait ainsi l'expansion des produits.

De plus, l'amplitude et le domaine de variation du temps de traitement choisi dans ce plan d'expériences est très faible par rapport à celui du premier plan, ce qui suggérerait une certaine importance de ce paramètre. Même si d'après les résultats du premier plan d'expériences réalisé lors des premiers travaux, le facteur teneur en eau initiale semblait avoir un effet plus favorable sur l'extraction du stachyose que sur le cicéritol ; on a pu vérifier sur la matière première l'effet de la réhumidification, et celle-ci n'a pas semblé influencer les résultats.

En considérant la répétabilité des points centraux, on constate la présence d'un écart important entre les différents points ; cet écart est de même ordre de grandeur que celui des points différemment traités par DIC, ce qui explique vraisemblablement l'absence d'effet des différents paramètres opératoires de la DIC sur la quantité maximale extraite. D'ailleurs en faisant l'analyse de l'effet des paramètres opératoires, au moyen de STATGRAPHICS, avec deux ou trois points centraux, le résultat est complètement différent.

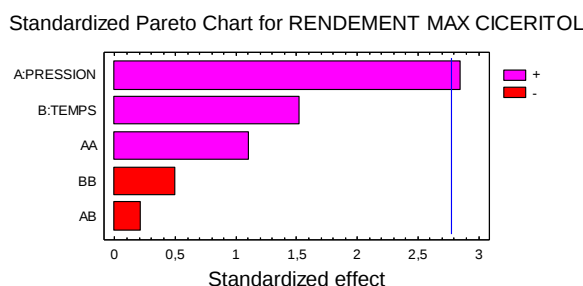


Figure III-13 : effet du traitement DIC sur le rendement total en cicéritol

Standardized Pareto Chart for RENDEMENT MAX STACHYOSE

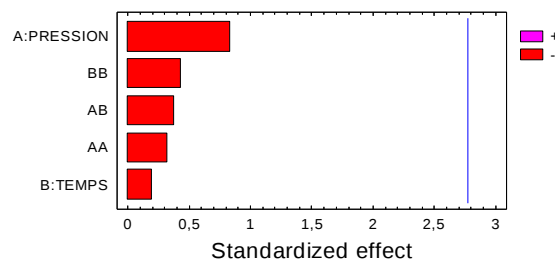


Figure III-14 : effet du traitement DIC sur le rendement total en stachyose

D'après la Figure III-13, dans le domaine de variation des paramètres opératoires, pour un intervalle de confiance de 5%, et en utilisant deux points centraux uniquement, l'effet simple de la pression semble être significatif. Cependant, le coefficient de corrélation entre le modèle et l'expérimentation ne dépasse pas les 0,76 ce qui reste faible et ne traduit pas une bonne adéquation entre le modèle et l'expérimentation. La même chose est observée pour le stachyose ou le coefficient de corrélation ne dépasse pas les 0,4.

De plus, Il est très probable aussi qu'on soit déjà dans la zone de traitement optimisé pour les deux paramètres opératoires, c'est ce qui explique l'absence d'effet de ces paramètres lors de l'analyse de la réponse (quantité maximale extraite en chaque marqueur) par STATGRAPHICS.

CHAPITRE III-3.

EFFET DE LA TEMPERATURE SUR L'EXTRACTION D'OLIGOSACCHARIDES

L'objectif de cette partie du travail est d'étudier l'effet de la température sur la cinétique d'extraction du cicéritol et du stachyose à partir des graines de *Tephrosia purpurea*.

Un plan d'expériences à deux paramètres opératoires de DIC (pression de vapeur et temps de traitement thermique) a été réalisé afin de définir les conditions à appliquer pour le traitement des graines broyées de *Tephrosia purpurea* de teneur initiale en eau fixée à 22%. Le choix de travailler avec des graines broyées sans effectuer de tamisage préalable, permet de se rapprocher des conditions d'utilisation à l'échelle industrielle. Le regroupe les conditions de traitement DIC appliquées sur les graines de *Tephrosia purpurea*.

Tableau III-13 : Conditions opératoires de la DIC

Numéro d'échantillon	Pression (MPa)	Temps de traitement (s)
1	0,54	209
2	0,54	61
3	0,26	209
4	0,26	61
5	0,4	240
6	0,4	30
7	0,6	135
8	0,2	135
9	0,4	135
10	0,4	135
11	0,4	135

Les cinétiques d'extraction pour les points différemment traités par DIC et pour la matière non traitées par DIC ont été réalisées à quatre températures différentes, à savoir 33 ; 45 ; 65 et 80 °C (303 ; 318 ; 338 et 353 K). Le suivi des cinétiques a été réalisé entre 15 min et 4h.

III-3.1. RESULTATS EXPERIMENTAUX

Le choix du solvant doit intervenir en fonction des composés à extraire, mais également, au plan cinétique, des propriétés physiques (viscosité, etc.). Les diverses courbes représentant l'évolution de la quantité des composés extraits, globale ou individuelle, en fonction du temps suivent des modèles dépendant de la structure propre de la matière mais également de la température d'extraction. Dans cette limite, il est parfaitement clair que le principal processus intervenant est étroitement lié à la diffusion du solvant à travers la structure propre de la matière. Dans la limite des précisions issues des conditions opératoires et de la variabilité inévitable de la matière première, les courbes expérimentales traduisant la cinétique d'extraction du cicéritol et du stachyose en fonction du temps présentent une allure exponentielle de la forme :

Équation III-5

$$\frac{(Y_{\infty} - Y)}{Y_{\infty} - Y_0} = ae^{-kt}$$

Avec

Y_{∞} : teneur (mg/g MS) maximale de soluté extraite au bout de 4h.

Y : quantité de marqueur extraite à t .

a, k : constantes

Notons que la valeur de k devra dépendre de la température ; nous nous inspirons des courbes cinétiques et adoptons une approche classique de type d'Arrhenius ;

Équation III-6:

$$k = k_0 e^{-\left(\frac{E_A}{RT}\right)}$$

Avec E_A ; l'énergie d'activation

Le traitement des résultats expérimentaux à travers la présentation : $Ln \frac{(Y_{\infty} - Y)}{Y_{\infty} - Y_0} = f(t)$

Équation III-5 devient :

Équation-III-7 :

$$Ln \frac{(Y_{\infty} - Y)}{Y_{\infty} - Y_0} = -kt + Lna$$

III-3.1.a. EVOLUTION AU COURS DU TEMPS

Dans les tableaux allant du Tableau III-14 au Tableau III-17 puis du Tableau III-18 au Tableau III-21 nous résumons les résultats obtenus (trois répétitions) pour l'extraction respective du cicéritol et du stachyose à partir de la matière non traitée par DIC (MP).

Tableau III-14 : Quantité de cicéritol (mg/g MS) extraite à 303 K à partir de graines non traitées par DIC (MP)

Temps (min)	MP	MP1	MP2	moyenne	Erreur estimée	Ecart type (%)
15	5,34	5,78	5,75	5,62	0,248	4,4
30	6,03	7,29	6,77	6,70	0,635	9,5
45	7,38	8,45	7,79	7,87	0,542	6,9
60	8,20	9,03	8,78	8,67	0,428	4,9
120	9,25	9,63	9,45	9,44	0,190	2,0
180	10,24	9,96	9,91	10,04	0,177	1,8
240	10,38	10,00	10,37	10,25	0,219	2,1

Tableau III-15 : Quantité de cicéritol (mg/g MS) extraite à 318 K à partir de graines non traitées par DIC (MP)

Temps (min)	MP	MP1	MP2	moyenne	Erreur estimée	Ecart type (%)
15	6,20	6,18	6,65	6,34	0,268	4,2
30	7,20	7,46	8,15	7,60	0,495	6,5
45	8,76	8,94	10,01	9,24	0,678	7,3
60	9,77	9,75	9,94	9,82	0,101	1,0
120	9,91	10,44	10,03	10,12	0,278	2,7
180	10,16	10,87	9,98	10,33	0,470	4,5

240	10,09	10,99	10,13	10,40	0,508	4,9
-----	-------	-------	-------	-------	-------	-----

Tableau III-16 : Quantité de cicéritol (mg/g MS) extraite à 338 K à partir de graines non traitées par DIC (MP)

Temps (min)	MP	MP1	MP2	moyenne	Erreur estimée	Ecart type (%)
15	7,90	6,40	7,53	7,27	0,782	10,7
30	9,02	7,72	8,93	8,56	0,729	8,5
45	9,85	8,51	9,75	9,37	0,742	7,9
60	10,35	9,21	10,17	9,91	0,611	6,2
120	10,59	9,30	10,14	10,01	0,656	6,6
180	10,81	9,76	10,37	10,31	0,528	5,1
240	10,94	9,73	10,44	10,37	0,607	5,9

Tableau III-17 : quantité de cicéritol (mg/g MS) extraite à 353 K à partir de graines non traitées par DIC (MP)

Temps (min)	MP	MP1	MP2	moyenne	Erreur estimée	Ecart type (%)
15	8,89	9,13	8,92	8,98	0,132	1,5
30	10,64	9,86	10,09	10,20	0,402	3,9
45	10,98	10,39	10,45	10,61	0,327	3,1
60	10,96	10,27	10,53	10,59	0,352	3,3
120	11,90	10,60	10,85	11,12	0,686	6,2
180	10,24	11,20	11,04	10,82	0,515	4,8
240	8,95	10,96	10,94	10,28	1,155	11,2

Tableau III-18 : quantité de stachyose (mg/g MS) extraite à 303 K à partir de graines non traitées par DIC (MP)

Temps (min)	MP	MP1	MP2	moyenne	Erreur estimée	Ecart type (%)
15	6,61	6,61	6,39	6,54	0,129	2,0
30	8,48	8,48	7,79	8,25	0,401	4,9
45	10,29	10,29	9,28	9,95	0,582	5,9
60	11,19	11,19	10,46	10,94	0,418	3,8
120	11,89	11,89	11,75	11,84	0,081	0,7
180	12,49	12,49	12,54	12,51	0,031	0,2
240	12,95	12,95	13,03	12,98	0,042	0,3

Tableau III-19 : quantité de stachyose (mg/g MS) extraite à 318 K à partir de graines non traitées par DIC (MP)

Temps (min)	MP	MP1	MP2	moyenne	Erreur estimée	Ecart type (%)
15	7,43	8,17	7,74	7,78	0,372	4,8
30	8,93	9,77	9,57	9,42	0,441	4,7
45	10,98	12,33	12,15	11,82	0,736	6,2
60	12,29	13,34	11,97	12,53	0,713	5,7
120	12,57	14,74	12,23	13,18	1,363	10,3
180	12,82	15,14	12,09	13,35	1,594	11,9
240	12,39	15,45	11,69	13,18	2,002	15,2

Tableau III-20 : quantité de stachyose (mg/g MS) extraite à 338 K à partir de graines non traitées par DIC (MP)

Temps (min)	MP	MP1	MP2	moyenne	Erreur estimée	Ecart type (%)
15	10,03	8,41	8,75	9,06	0,855	9,4
30	11,35	10,43	10,60	10,79	0,489	4,5
45	12,81	11,66	11,97	12,15	0,595	4,9
60	13,48	12,70	12,51	12,89	0,515	4,0
120	13,75	13,02	12,50	13,09	0,627	4,8
180	13,83	13,79	12,87	13,50	0,540	4,0
240	14,24	13,90	12,80	13,65	0,748	5,5

Tableau III-21 : quantité de stachyose (mg/g MS) extraite à 353 K à partir de graines non traitées par DIC (MP)

Temps (min)	MP	MP1	MP2	moyenne	Erreur estimée	Ecart type (%)
15	11,39	12,03	10,50	11,31	0,767	6,8
30	14,05	13,51	12,46	13,34	0,811	6,1
45	14,94	14,29	13,05	14,09	0,963	6,8
60	14,97	14,80	13,27	14,35	0,934	6,5
120	15,56	15,02	13,51	14,69	1,066	7,3
180	13,68	15,76	14,08	14,50	1,105	7,6
240	12,84	15,40	13,73	13,99	1,302	9,3

Pour les points traités par DIC, on remarque une amélioration en termes de cinétique et de rendement d'extraction du cicéritol et du stachyose. La figure IV-22 et IV-23 présentent une comparaison entre la cinétique d'extraction du cicéritol et du stachyose à partir de la matière première et à partir de graines traitées différemment par DIC, à 45 °C. Ces points donnent de meilleurs résultats. En effet, la même quantité est obtenue à partir d'1h par rapport à 4h avec la matière première. Avec la DIC la quantité maximale extraite de cicéritol et de stachyose est améliorée jusqu'à 128 et 139% respectivement.

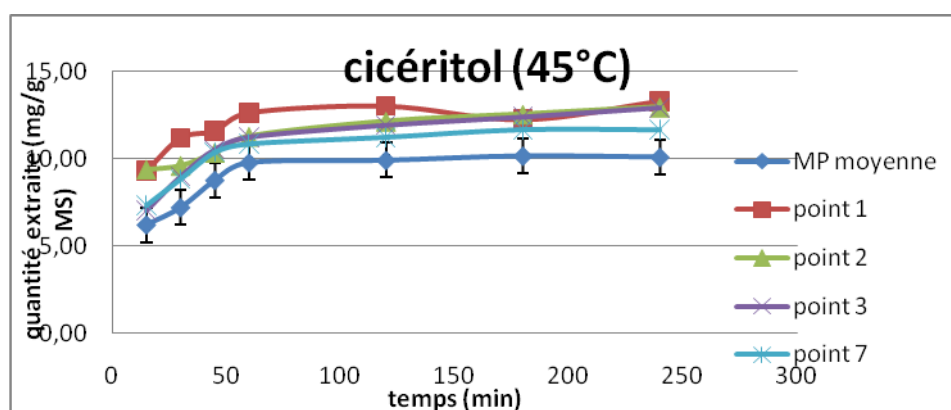


Figure III-15 : Cinétique d'extraction du cicéritol à partir de graines non traitées et de graines différemment traitées par DIC, à 45 °C.

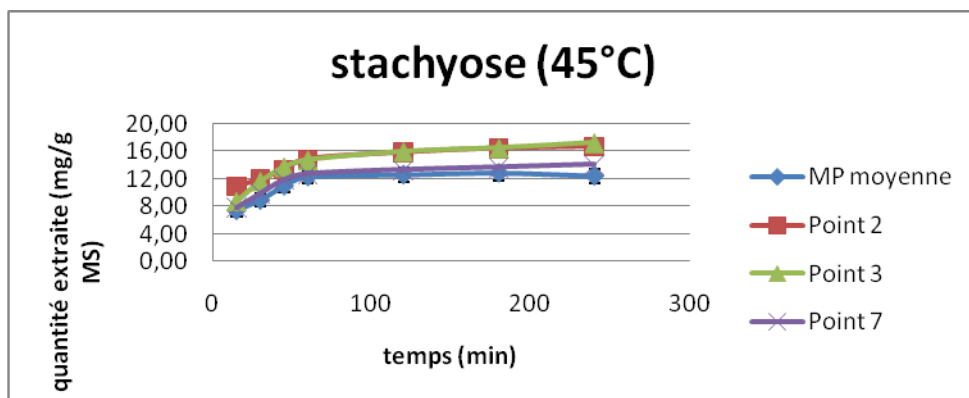


Figure III-16 : Cinétique d'extraction du stachyose à partir de graines non traitées et de graines différemment traitées par DIC, à 45 °C.

La représentation sous la forme de $\ln(Y_{\infty} - Y / Y_{\infty} - Y_0)$ en fonction de t permet donc d'aboutir à des droites avec $y = k \cdot t + a$; la pente k , doit évoluer avec $\ln(k)$ en fonction de $1/T$; d'après Équation III-6, la pente de la droite obtenue représente la quantité $-E_A/RT$.

Nous représentons ainsi (Figure III-17 à Figure III-36) les résultats des extractions du cicéritol et du stachyose, à différentes températures pour la MP et pour les différents points de traitements par DIC. Il est important de préciser que lors de cette présentation on ne s'est intéressé qu'à la première partie de la cinétique car pour la deuxième partie de la courbe, la présence d'un palier rend l'écart entre les différentes valeurs faible ce qui induit une augmentation évidente de l'erreur due à la présentation logarithmique.

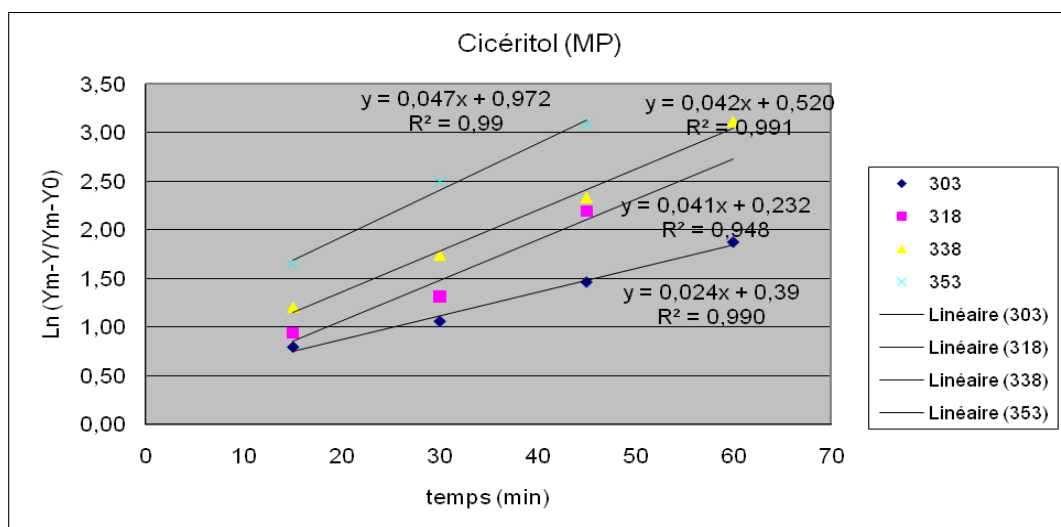


Figure III-17 : Présentation logarithmique de la cinétique d'extraction (cicéritol MP)

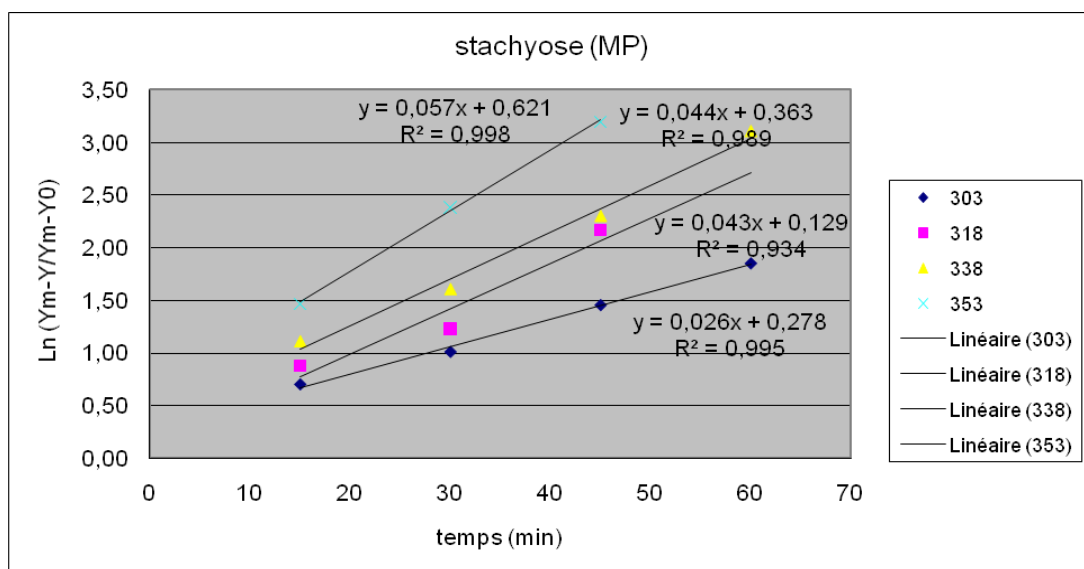


Figure III-18 : Présentation logarithmique de la cinétique d'extraction (stachyose MP)

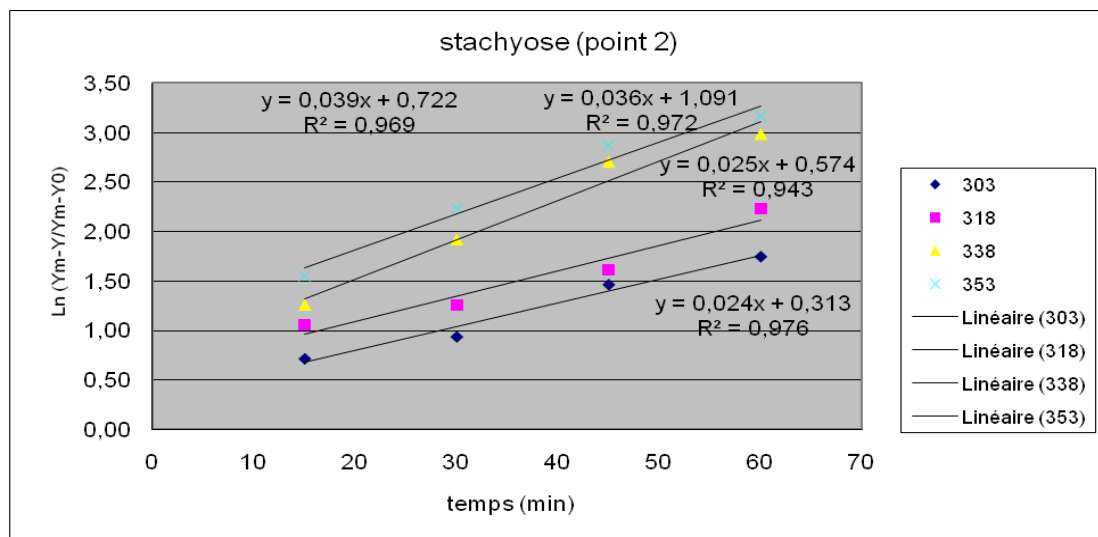


Figure III-19 : Présentation logarithmique de la cinétique d'extraction (stachyose point 2)

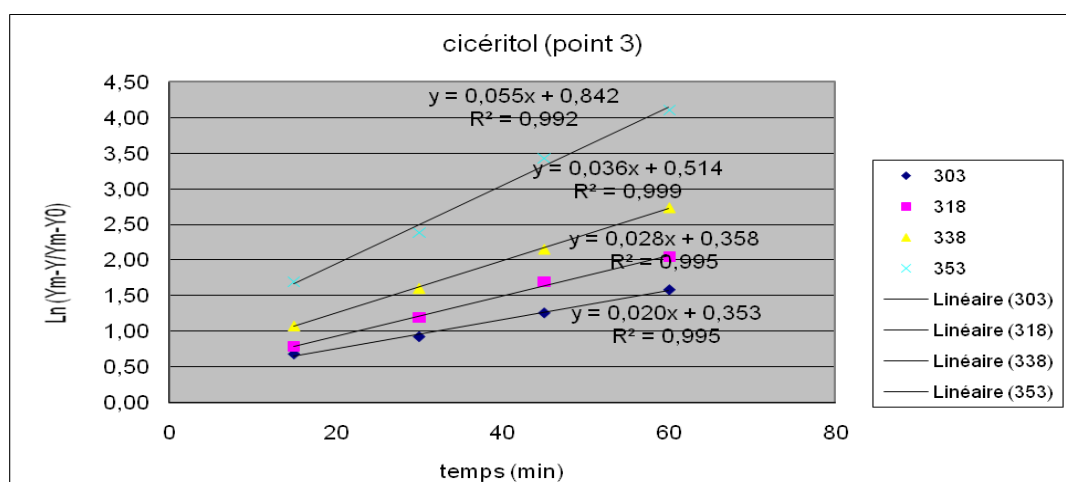


Figure III-20 : Présentation logarithmique de la cinétique d'extraction (cicéritol point 3)

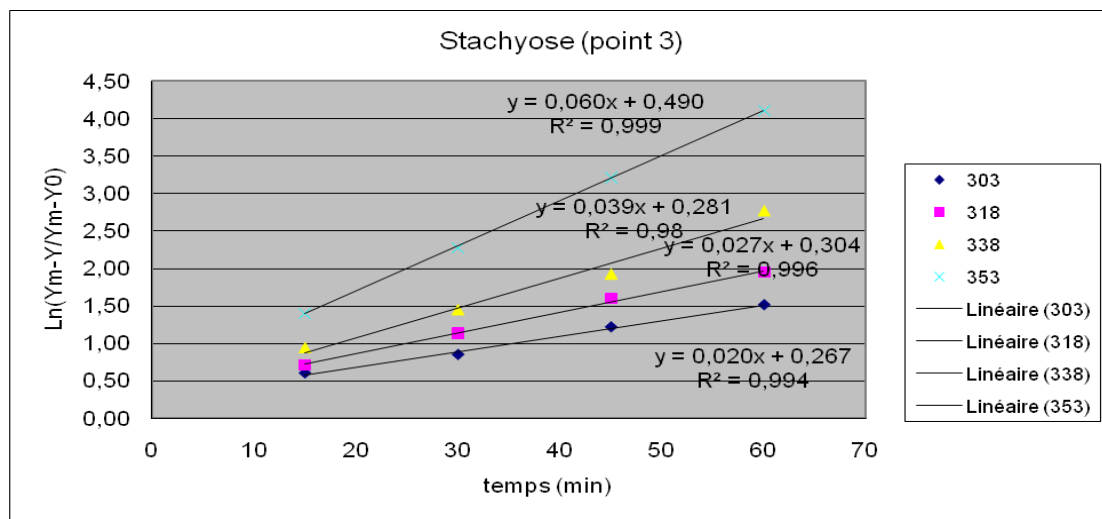


Figure III-21 : Présentation logarithmique de la cinétique d'extraction (stachyose point 3)

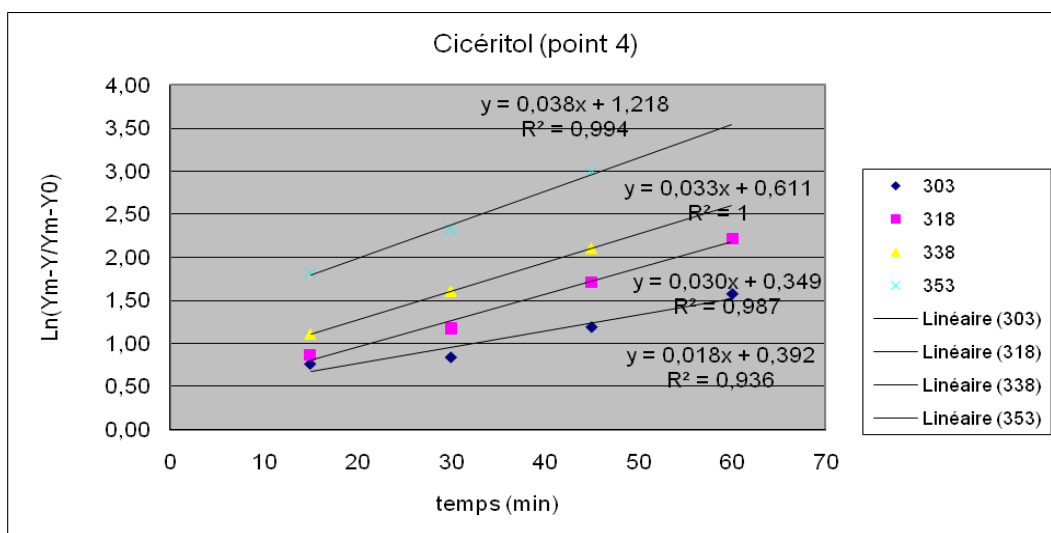


Figure III-22 : Présentation logarithmique de la cinétique d'extraction (cicéritol point 4)

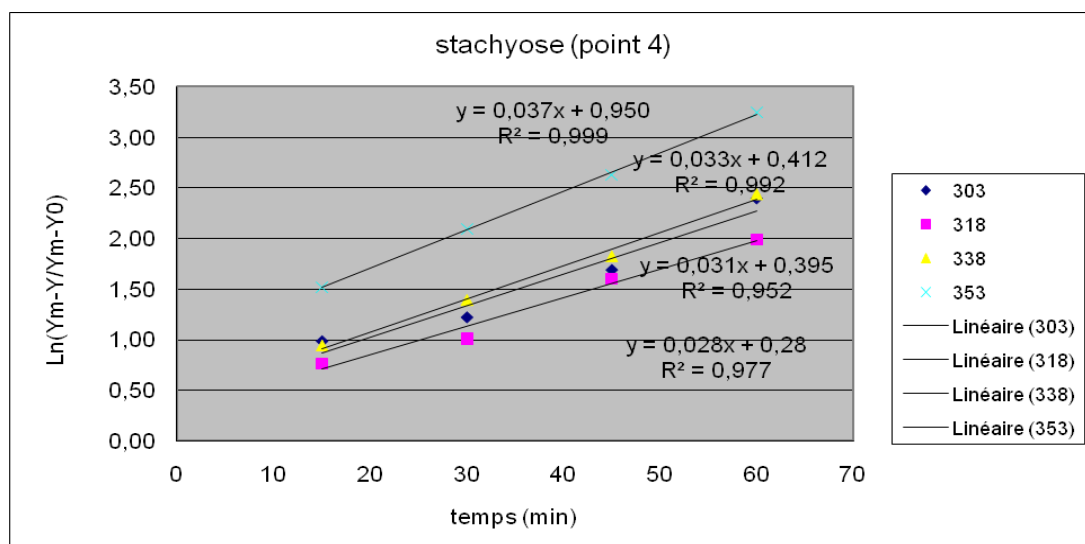


Figure III-23 : Présentation logarithmique de la cinétique d'extraction (stachyose point 4)

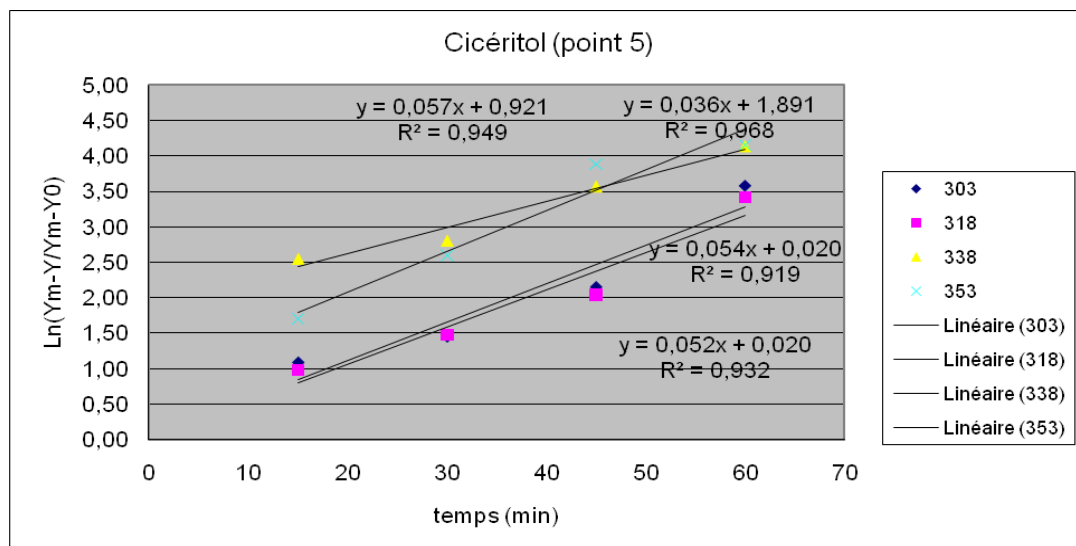


Figure III-24 : Présentation logarithmique de la cinétique d'extraction (cicéritol point 5)

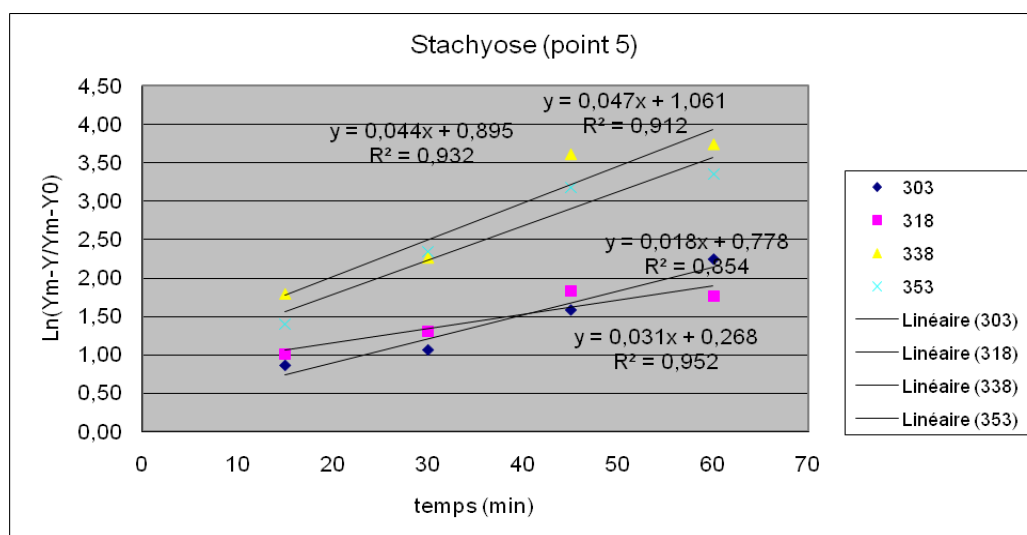


Figure III-25 : Présentation logarithmique de la cinétique d'extraction (stachyose point 5)

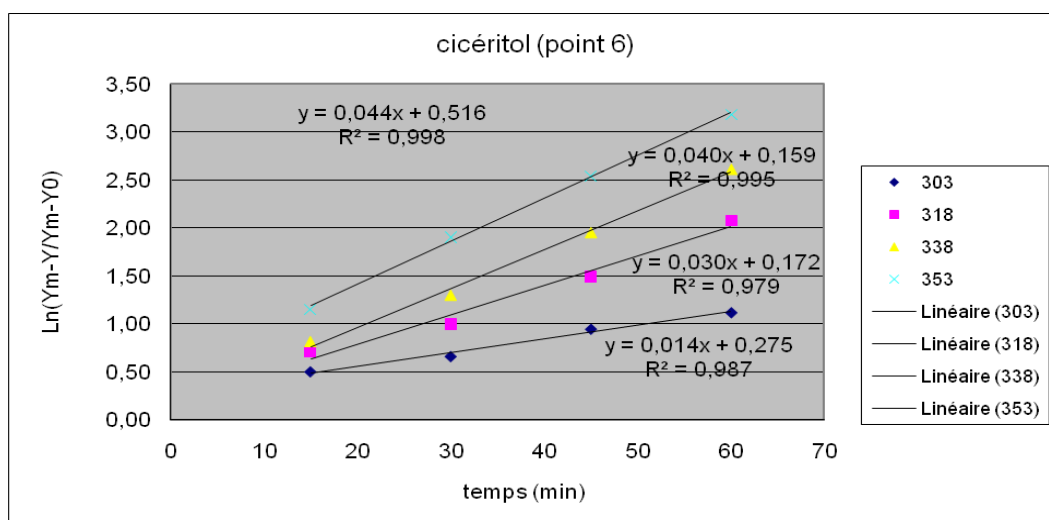


Figure III-26 : Présentation logarithmique de la cinétique d'extraction (cicéritol point 6)

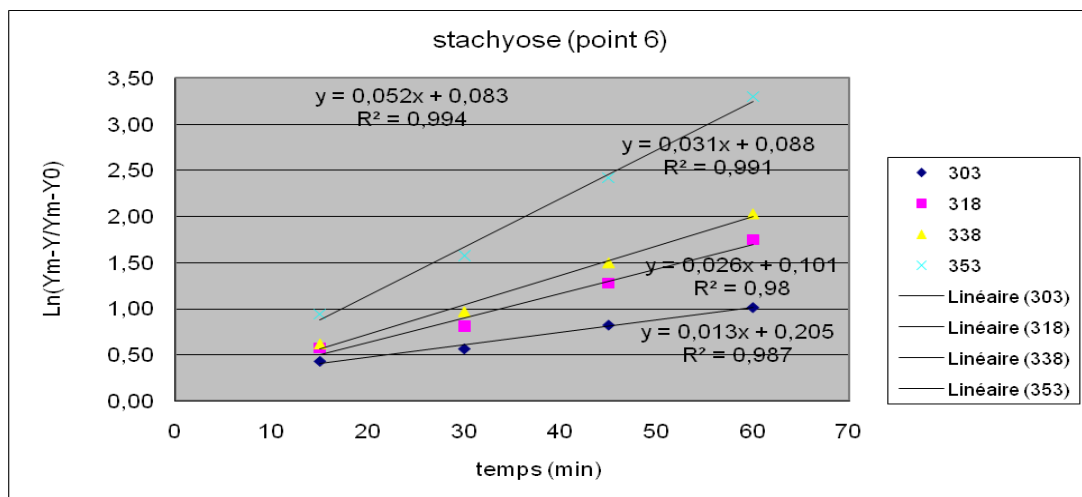


Figure III-27 : Présentation logarithmique de la cinétique d'extraction (stachyose point 6)

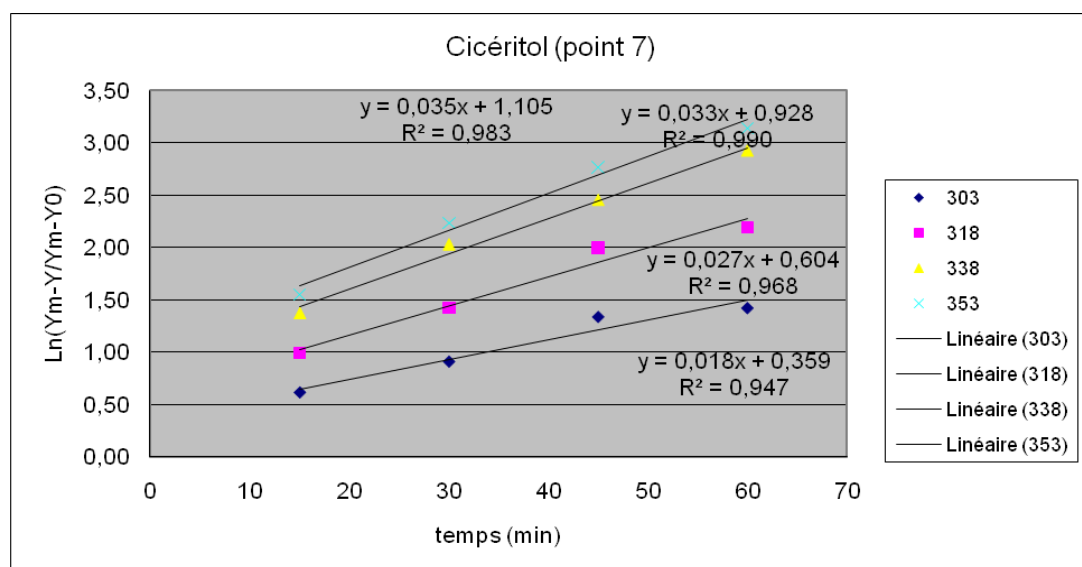


Figure III-28 : Présentation logarithmique de la cinétique d'extraction (cicéritol point 7)

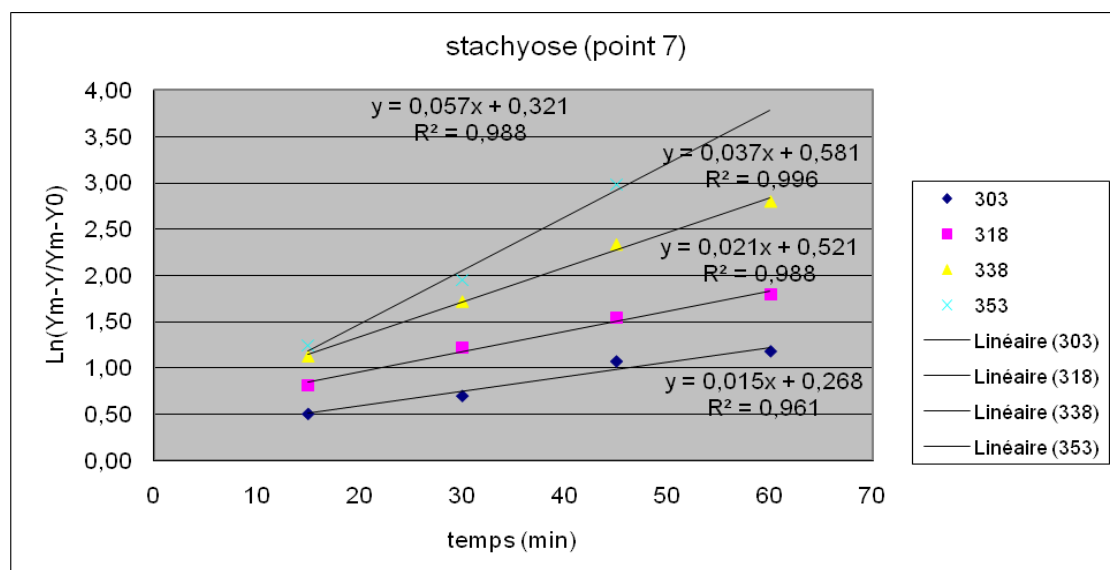


Figure III-29 : Présentation logarithmique de la cinétique d'extraction (stachyose point 7)

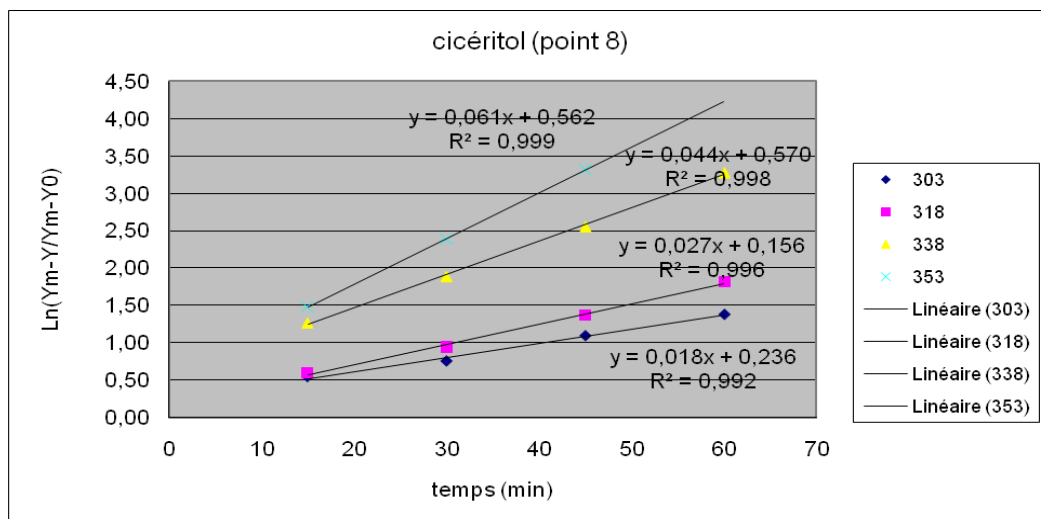


Figure III-30 : Présentation logarithmique de la cinétique d'extraction (cicéritol point 8)

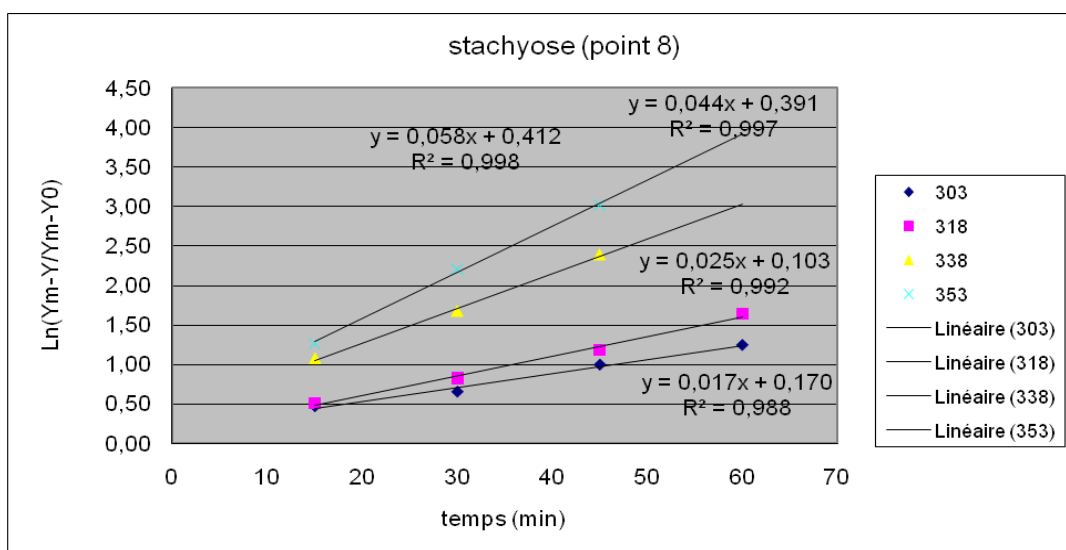


Figure III-31 : Présentation logarithmique de la cinétique d'extraction (stachyose point 8)

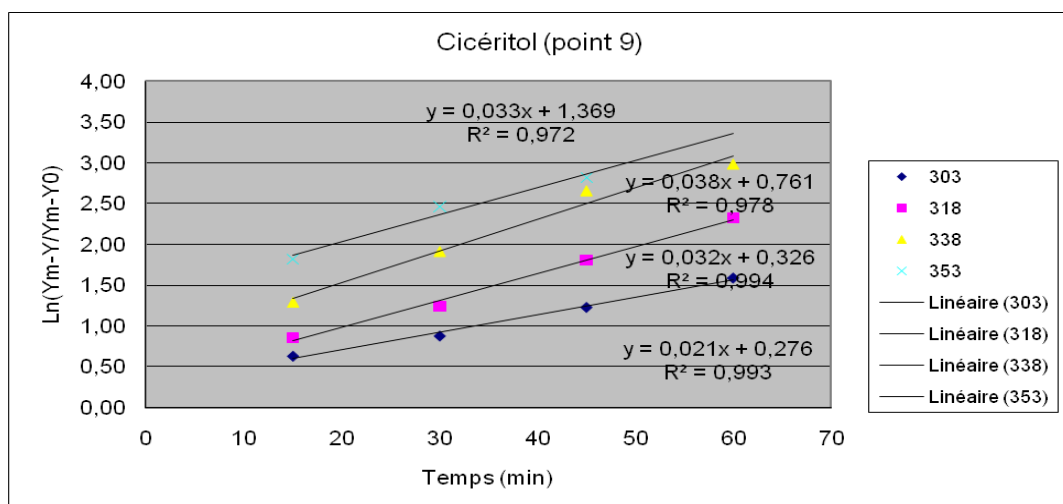


Figure III-32 : Présentation logarithmique de la cinétique d'extraction (cicéritol point 9)

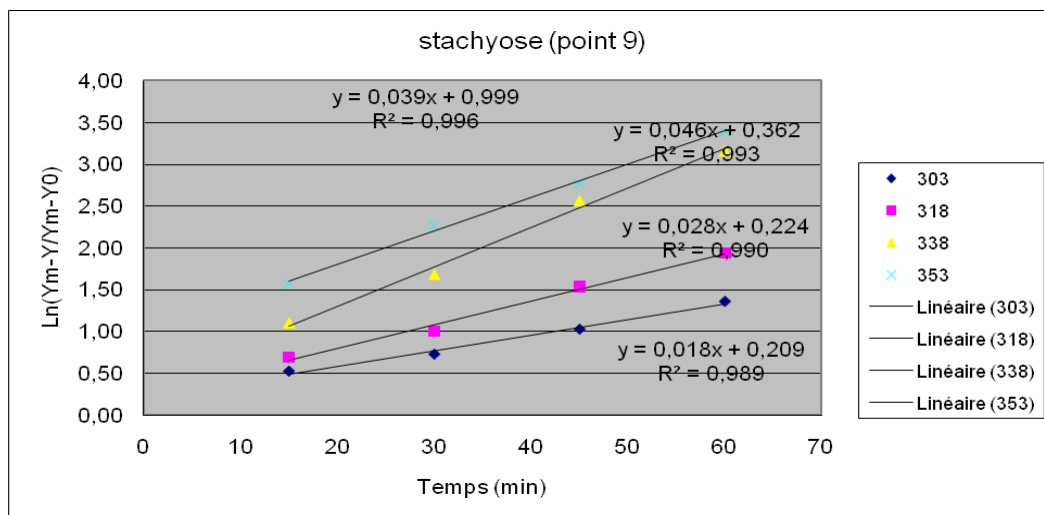


Figure III-33 : Présentation logarithmique de la cinétique d'extraction (stachyose point 9)

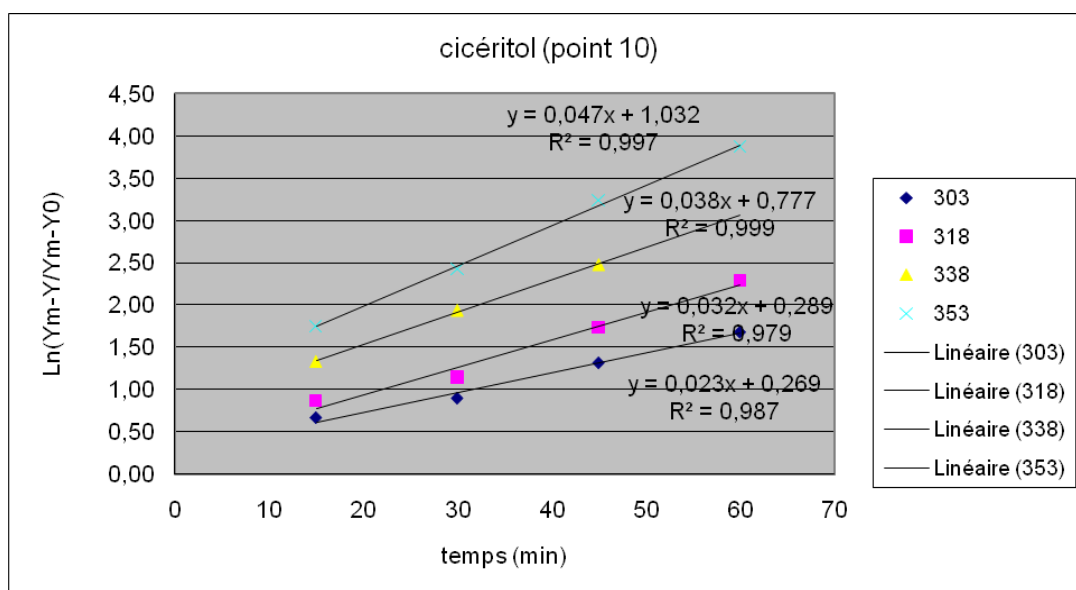


Figure III-34 : Présentation logarithmique de la cinétique d'extraction (cicéritol point 10)

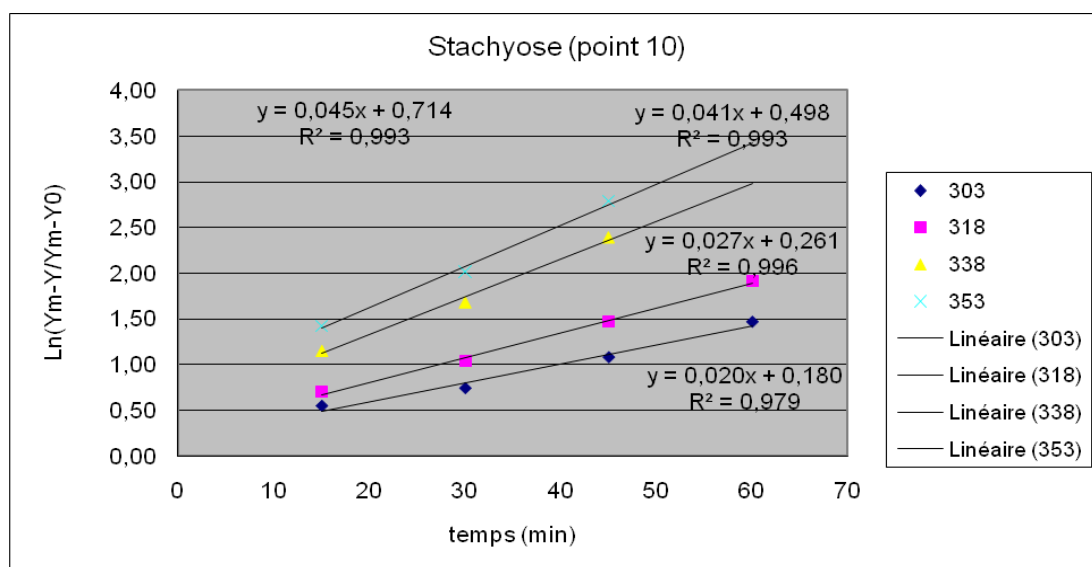


Figure III-35 : Présentation logarithmique de la cinétique d'extraction (stachyose point 10)

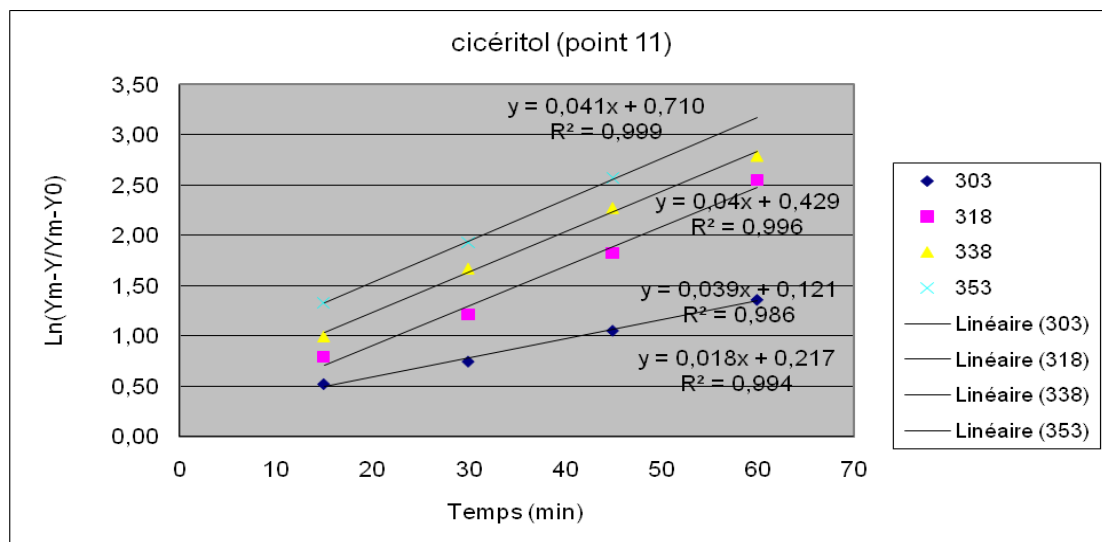


Figure III-36 : Présentation logarithmique de la cinétique d'extraction (cicéritol point 11)

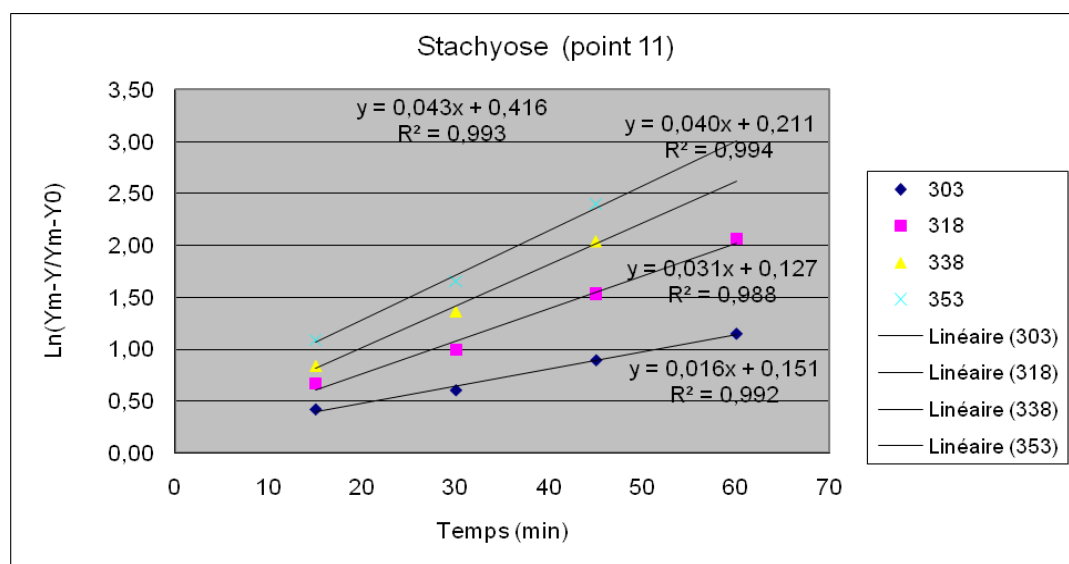


Figure III-37 : Présentation logarithmique de la cinétique d'extraction (stachyose point 11)

A partir des différentes valeurs de K, on peut déterminer la diffusivité du cicéritol et du stachyose en fonction de la température, en utilisant la solution de la seconde loi de Fick, dans le cas d'une sphère, et en se limitant au premier terme de la série :

Tableau III-22 : diffusivité du cicéritol et du stachyose, extrait à partir de graines différemment traitées par DIC, à différentes températures.

	Diffusivité cicéritol*10 ¹² (m ² .s ⁻¹)				Diffusivité stachyose*10 ¹² (m ² .s ⁻¹)			
Point	303	318	338	353	303	318	338	353
MP	2,95	5,05	5,18	5,80	3,20	5,30	5,42	7,02
3	2,47	3,45	4,43	6,78	2,47	3,33	4,80	7,40
4	2,22	3,70	4,07	4,68	3,82	3,45	4,07	4,57
6	1,73	3,70	4,93	5,42	2,47	3,33	4,80	7,40
7	2,22	3,33	4,07	4,32	1,85	2,58	4,57	7,02
8	2,22	3,33	5,30	7,52	2,10	3,08	5,42	7,15
10	2,83	3,95	4,68	5,80	2,47	3,33	5,05	5,55
11	2,22	4,80	4,93	5,05	2,10	3,08	5,42	7,15

On remarque que les valeurs de la diffusivité augmentent avec la température et que l'augmentation est variable ; cependant, l'impossibilité de déterminer la diffusivité du cicéritol et du stachyose pour certains points de traitement par DIC, ne permet pas de tirer des conclusions sur l'effet de la température sur la diffusivité en fonction des paramètres opératoires de la DIC (pression et temps de traitement). Nous suggérons une étude plus approfondies sur l'effet de la température sur la diffusivité de ces deux marqueurs.

III-3.1.b. ENERGIE D'ACTIVATION

La présentation de k en fonction de 1/T (où La température T est exprimée en Kelvin (K) doit permettre d'aboutir à une droite de pente égale à E_A/R (avec R la constante des gaz parfaits).

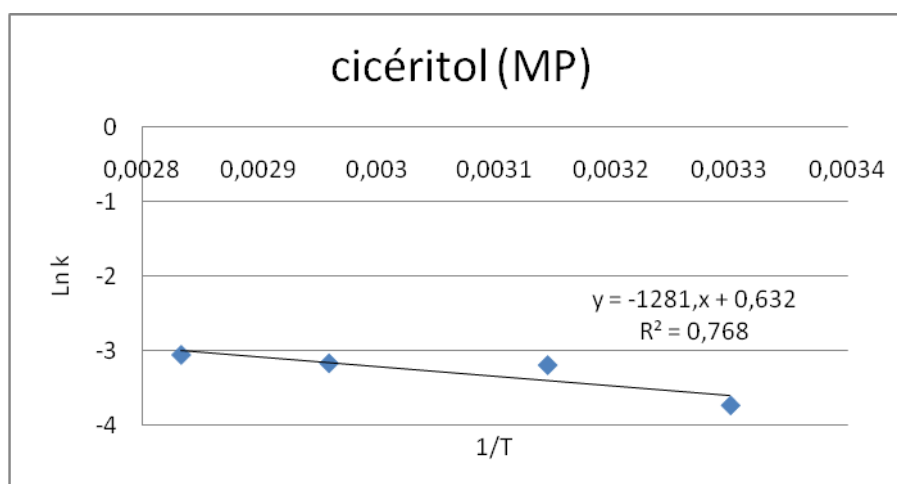


Figure III-38 : Analyse phénoménologique de la cinétique d'extraction du cicéritol à partir de MP

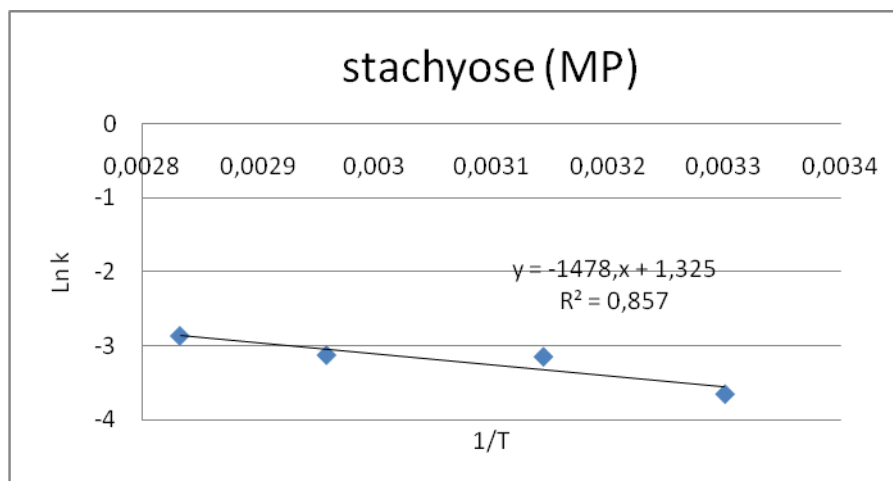


Figure III-39 : Analyse phénoménologique de la cinétique d'extraction du stachyose à partir de MP

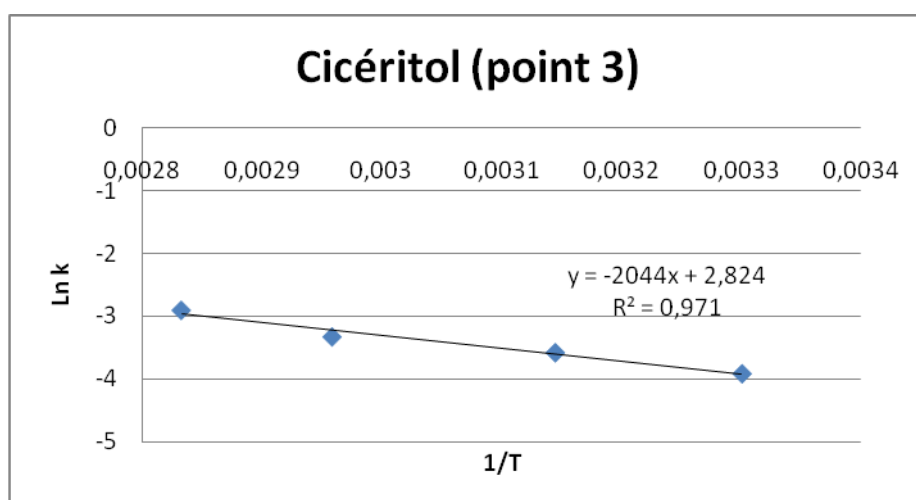


Figure III-40 : Analyse phénoménologique de la cinétique d'extraction du cicéritol à partir de point 3

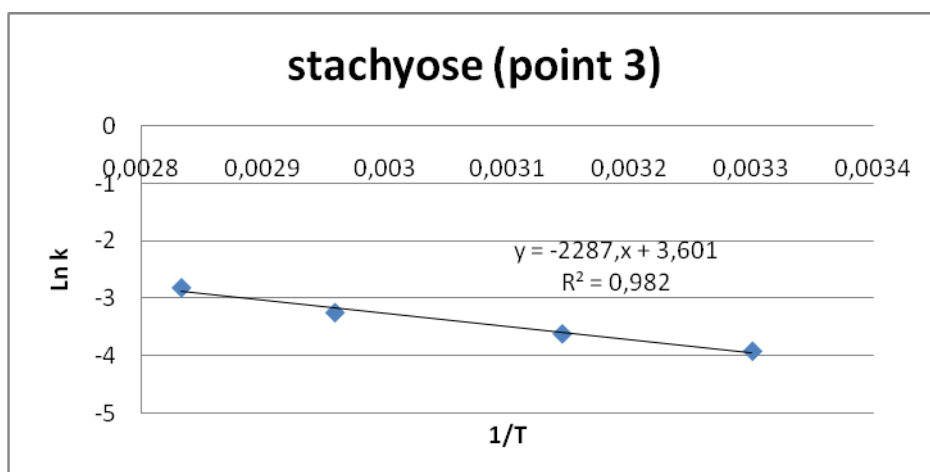


Figure III-41 : Analyse phénoménologique de la cinétique d'extraction du stachyose à partir de point 3

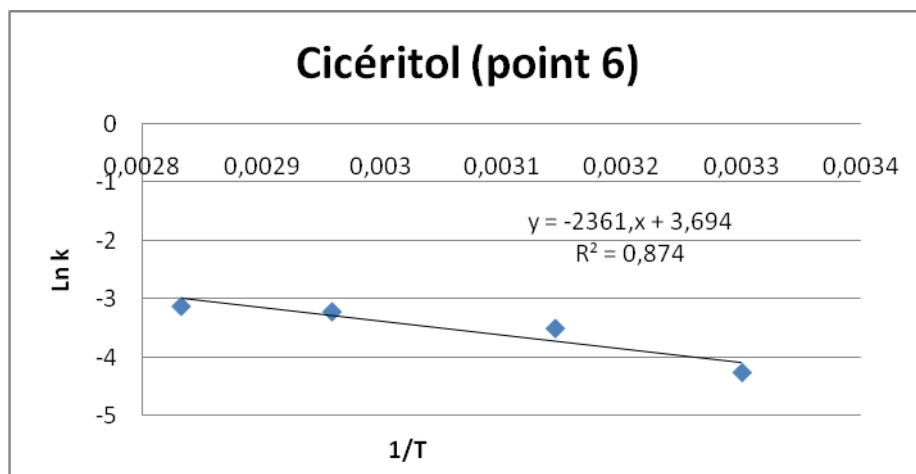


Figure III-42 : Analyse phénoménologique de la cinétique d'extraction du cicéritol à partir de point 6

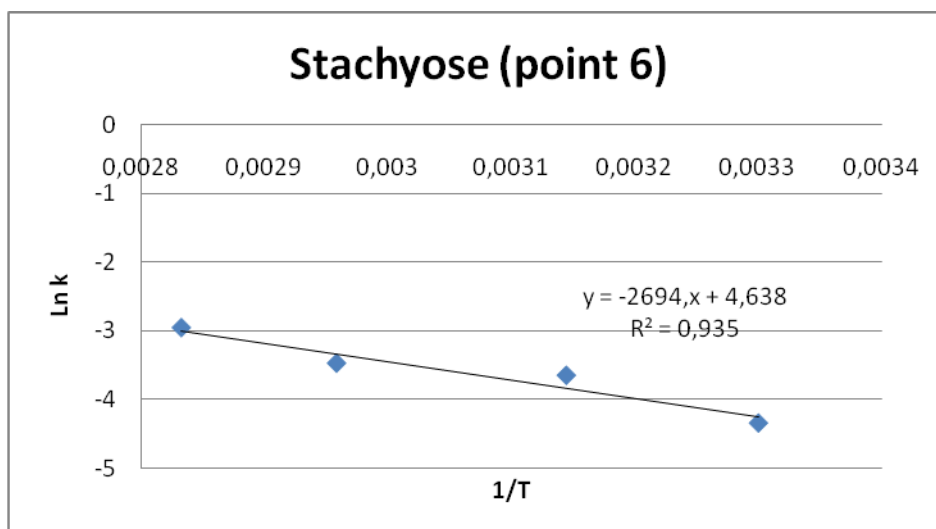


Figure III-43 : Analyse phénoménologique de la cinétique d'extraction du stachyose à partir de point 6

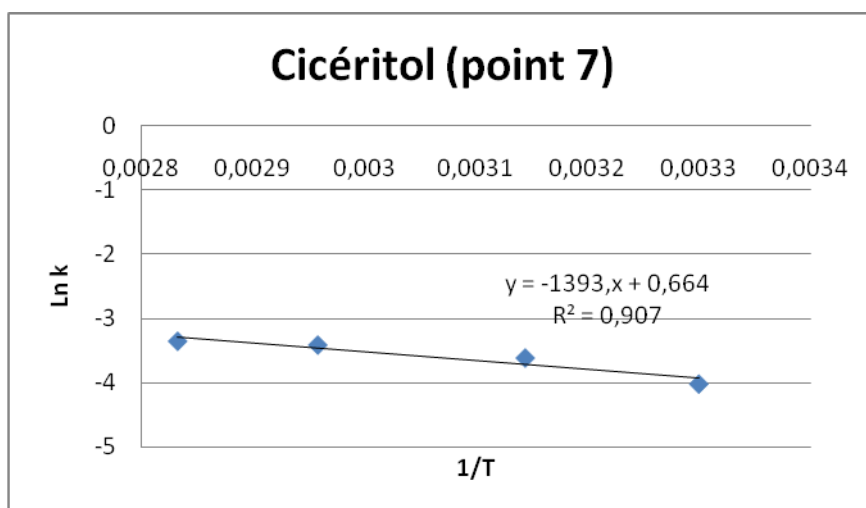


Figure III-44 : Analyse phénoménologique de la cinétique d'extraction du cicéritol à partir de point 7

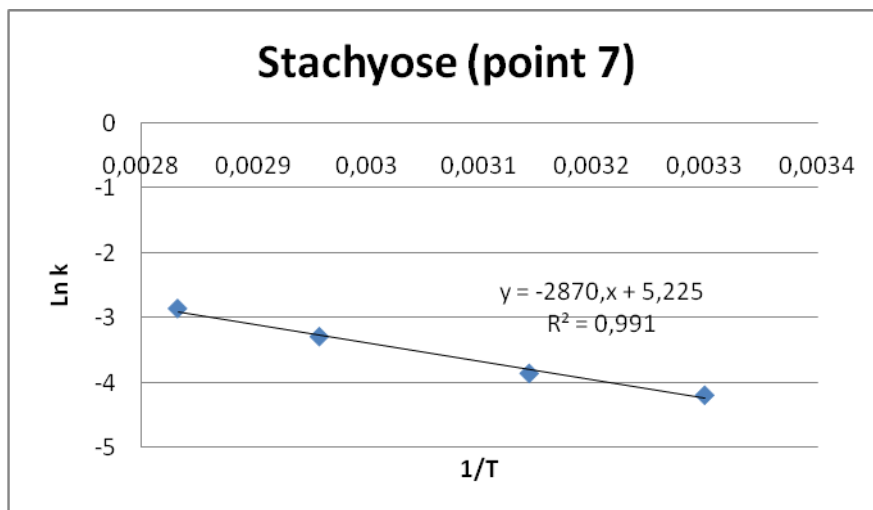


Figure III-45 : Analyse phénoménologique de la cinétique d'extraction du stachyose à partir de point 7

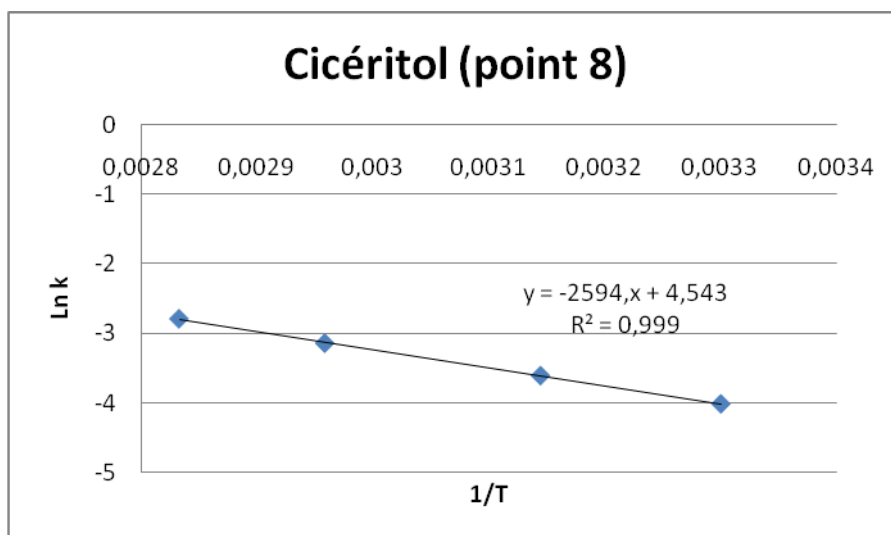


Figure III-46 : Analyse phénoménologique de la cinétique d'extraction du cicéritol à partir de point 8

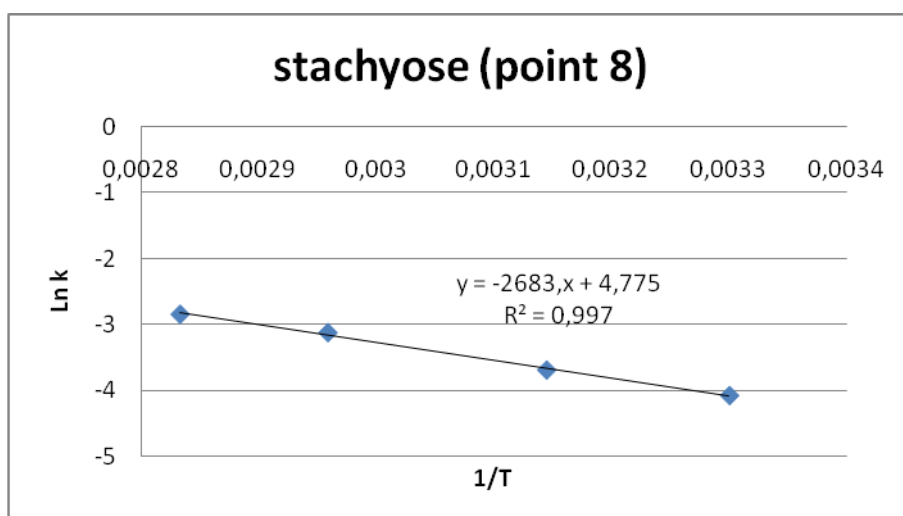


Figure III-47 : Analyse phénoménologique de la cinétique d'extraction du stachyose à partir de point 8

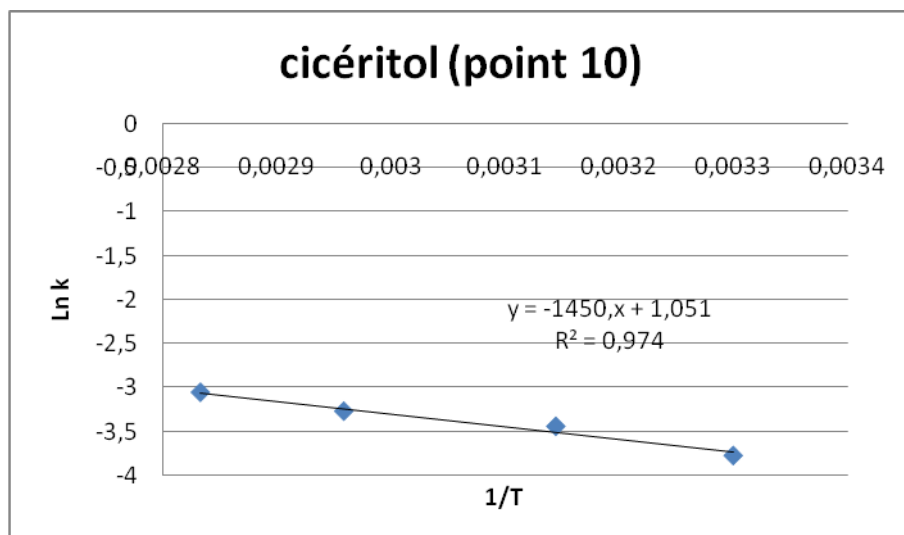


Figure III-48 : Analyse phénoménologique de la cinétique d'extraction du cicéritol à partir de point 10

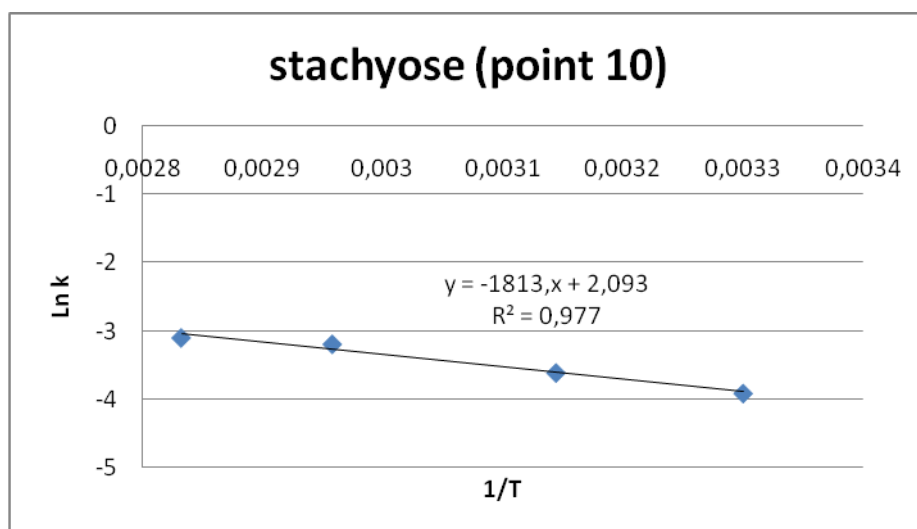


Figure III-49 : Analyse phénoménologique de la cinétique d'extraction du stachyose à partir de point 10

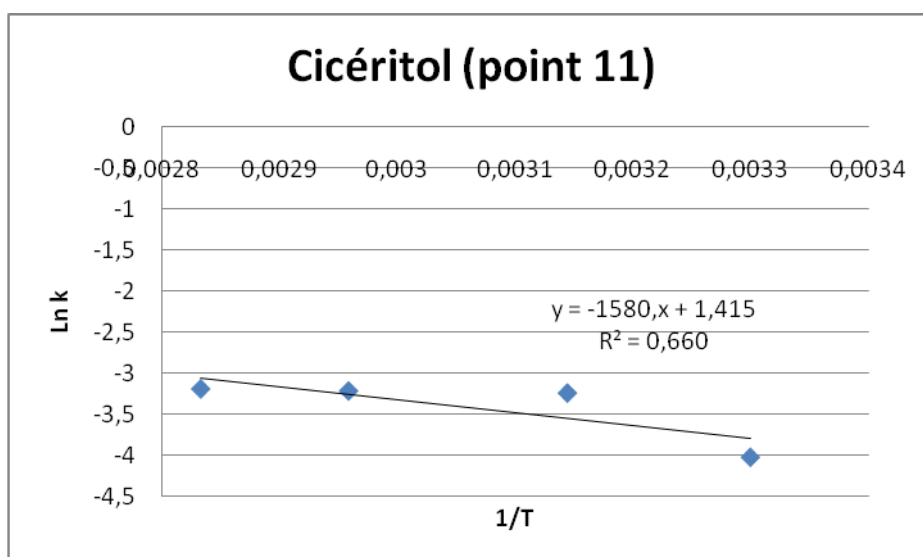


Figure III-50 : Analyse phénoménologique de la cinétique d'extraction du cicéritol à partir de point 11

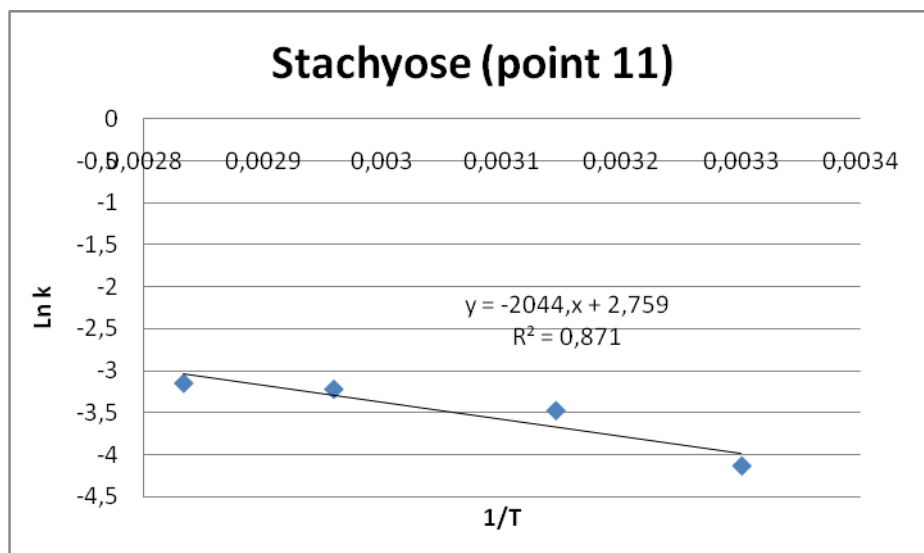


Figure III-51 : Analyse phénoménologique de la cinétique d'extraction du stachyose à partir de point 11

Nous avons ainsi pu quantifier l'énergie d'activation E_A du modèle phénoménologique pour la plupart des points (Tableau III-23 : Energie d'activation selon le modèle phénoménologique de la cinétique d'extraction du cicéritol et du stachyose.). Pour les autres points, l'absence de l'analyse de l'effet de la température et les éventuelles erreurs de quantification nous ont empêchés de faire l'étude complète de l'effet de la température et ainsi estimer l'énergie d'activation.

Ces valeurs d'énergie d'activation demeurent faibles pour les deux marqueurs (cicéritol, stachyose) et varient globalement entre 10 et 21 kJ/mol pour le cicéritol et entre 9 et 24 kJ/mol pour le stachyose.

Tableau III-23 : Energie d'activation selon le modèle phénoménologique de la cinétique d'extraction du cicéritol et du stachyose.

Point	Ea (kJ /mol)	
	CICERITOL	STACHYOSE
2	-	9,64
3	16,99	19,01
6	19,63	22,4
7	11,58	23,86
8	21,57	22,31
10	12,06	15,07
11	13,14	16,99
MP	11,61	23,83
MP MOY	10,65	12,29

Lors de cette étude, on a rencontré plusieurs difficultés dont principalement la complexité de quantification : en effet ce type d'étude comparative nécessite un nombre très important de points (cinétique, plan d'expérience, température), de plus la méthode de quantification dont on dispose (HPLC) est insuffisante pour ce type d'étude, c'est pour cette raison qu'il serait indispensable de penser à une autre méthode de quantification et de dosage qui soit plus précise, plus rapide et plus fiable. Nous pensons par exemple à un système d'UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography), faisant appel aux mêmes principes que l'HPLC, mais qui apporte un progrès majeur dans trois domaines : résolution chromatographique, vitesse d'analyse et sensibilité.

Dans cette optique, et pour confirmer les résultats annoncés dans ce travail, une analyse plus approfondie et plus détaillée serait parmi les perspectives qu'il faudrait envisager.

III-3.2. OPTIMISATION DU PROCEDE D'EXTRACTION

Généralement, le choix du solvant est réalisé en vue d'assurer une meilleure diffusion de ce solvant à travers la matrice solide et avoir une bonne capacité de mise en solution du soluté à extraire. Ayant amélioré la diffusion du solvant au moyen de l'expansion de la matrice solide, nous devrions avoir plus de facilité à choisir le solvant. Ce choix sera principalement basé sur la capacité du solvant à la mise en solution des molécules recherchées et nettement moins sur la base des propriétés de diffusion propres au liquide (viscosité...).

Après avoir optimisé et identifié les conditions opératoires du traitement par DIC (5.6 bars ; 61 s ; 22%) permettant de donner le meilleur rendement en les deux marqueurs qui nous intéressent (cicéritol et stachyose), on a visé de modifier le protocole expérimental d'extraction, en jouant sur deux paramètres importants, à savoir la concentration en éthanol et la température d'extraction. A cet effet, on a réalisé des cinétiques d'extractions à différentes températures (303, 318, 338, 353 K) pour différentes concentrations en éthanol (70%, 50% et 25%).

Pour chaque solvant, défini par sa concentration en éthanol, nous remarquons que la température intervient et globalement plus la température est élevée, plus rapide est le démarrage de l'extraction. On peut déceler une certaine amélioration de l'opération avec la température mais qui reste négligeable. Ceci nous amène donc à garder une température moyenne à savoir 40 °C.

Cependant en terme de concentration en éthanol, peu de différence est décelé entre les différents solvants d'extraction ce qui nous amène à privilégier la plus faible concentration en éthanol (25%).

Il a été impossible pour nous, pour des raisons expérimentales, de réaliser l'opération avec l'eau toute seule, alors que le traitement par DIC pouvait cependant à travers la débactérisation de la matière première solide faciliter cette adoption.

Tableau III-24 : quantité (mg/g MS) de cicéritol extrait en fonction de la température et du solvant

	303 (K)			318 (K)			338 (K)			353 (K)		
Temps (min)	25%	50%	70%	25%	50%	70%	25%	50%	70%	25%	50%	70%
15	4,42	9,39	7,08	4,28	8,92	7,20	7,73	10,17	11,14	9,68	10,82	10,83
30	5,83	10,89	6,89	7,59	11,32	8,36	9,93	11,91	9,79	10,97	11,23	
45	8,12	11,34	8,90	8,10	11,67	9,85	11,07	11,86	10,96		11,85	11,89
60	9,56	11,75	9,23	9,01	12,04	10,93	13,94	12,26	12,42	12,26	11,93	12,58
120	11,22	12,34	10,38	10,23	13,25	12,05	14,42	12,21	11,59	12,82	12,27	11,85
180	11,56	12,12	11,75	12,08	12,17	12,05	12,58	12,40	11,62	11,97	12,04	12,21
240	12,12	12,27	11,35	12,13	11,74	11,34	12,58	12,34	11,90	11,19	12,43	12,41

Tableau III-25 : quantité (mg/g MS) de stachyose extrait en fonction de la température et du solvant

	303 (K)			318 (K)			338 (K)			353 (K)		
Temps (min)	25%	50%	70%	25%	50%	70%	25%	50%	70%	25%	50%	70%
15	5,03	12,74	8,26	4,83	12,11	8,83	9,41	14,40	12,41	12,00	14,88	13,59
30	6,70	14,92	8,05	8,76	15,64	10,26	12,44	16,99	13,85	14,31	16,26	

45	9,92	15,85	10,86	9,76	16,55	12,34	14,76	17,02	13,93		17,12	16,48
60	11,75	16,71	11,46	11,34	17,38	14,07	18,54	17,49	15,85	16,93	17,07	16,03
120	14,77	17,56	13,09	13,73	17,63	15,24	19,71	17,65	15,08	17,20	17,35	16,26
180	15,00	17,24	15,08	16,16	17,01	15,03	17,66	17,77	14,94	16,64	17,19	16,52
240	15,90	17,58	15,14	20,52	16,87	14,00	17,64	17,93	15,45	15,39	17,89	16,58

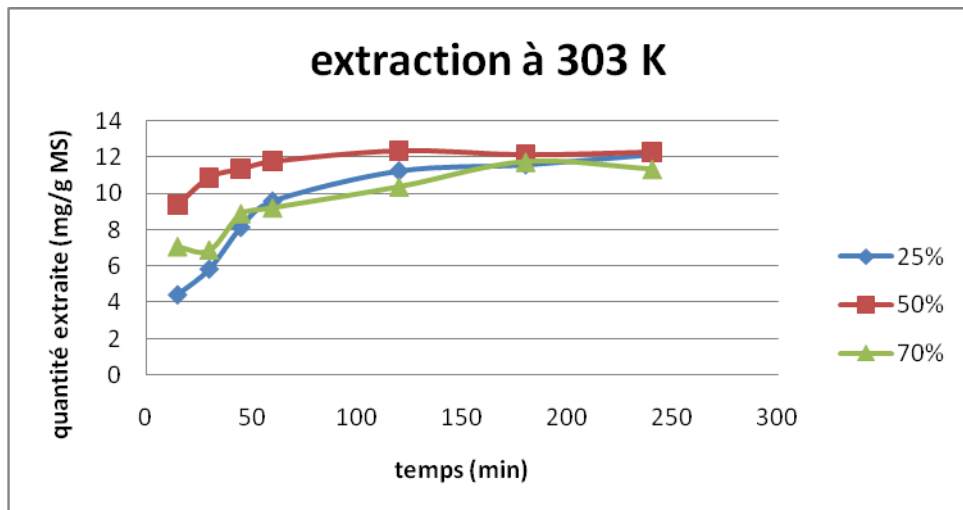


Figure III-52 : effet du solvant sur l'extraction du cicéritol à partir de graines de *Tephrosia purpurea* traitées par DIC (5.6 bars ; 61 s ; 22%) à 303 K.

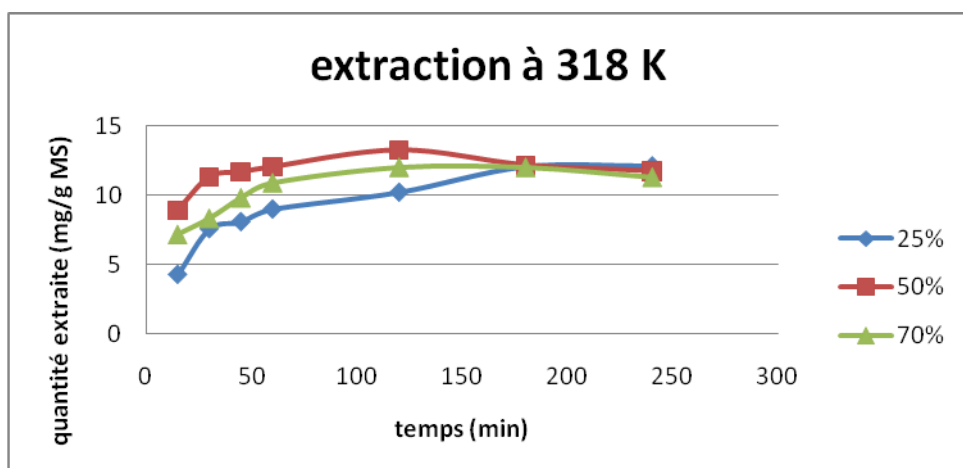


Figure III-53 : effet du solvant sur l'extraction du cicéritol à partir de graines de *Tephrosia purpurea* traitées par DIC (5.6 bars ; 61 s ; 22%) à 318 K.

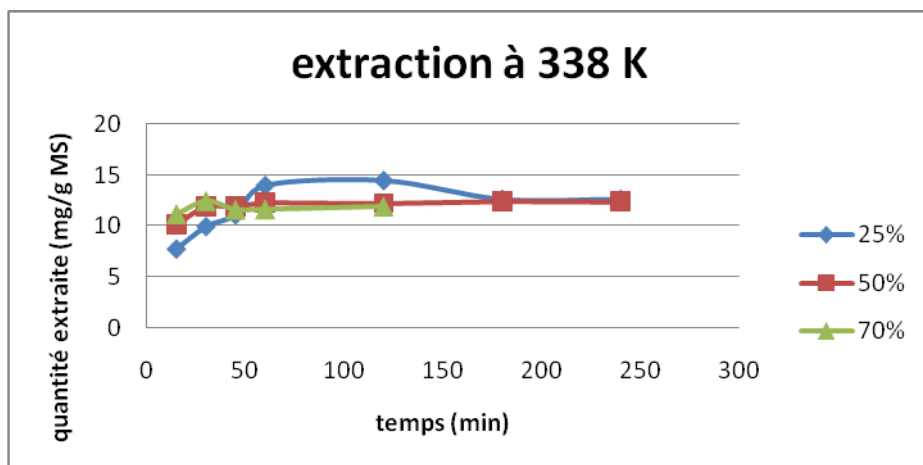


Figure III-54: effet du solvant sur l'extraction du cicéritol à partir de graines de *Tephrosia purpurea* traitées par DIC (5.6 bars ; 61 s ; 22%) à 338 K.

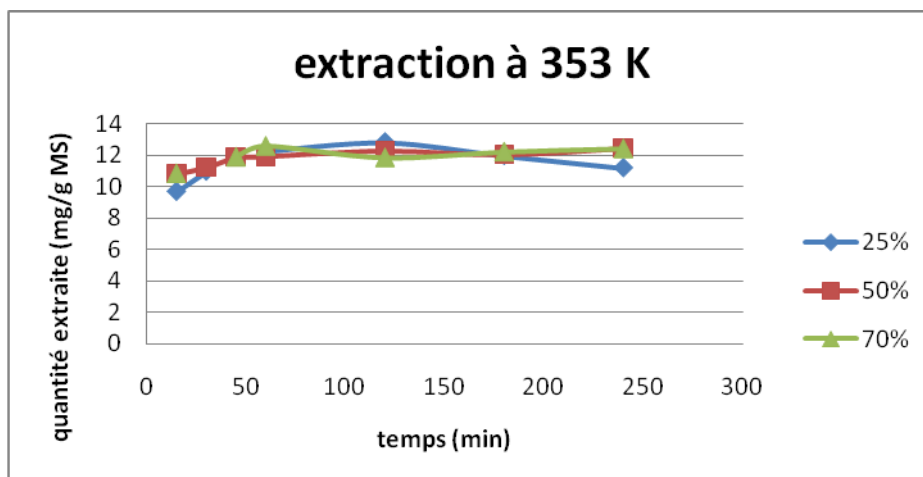


Figure III-55: effet du solvant sur l'extraction du ciceritol à partir de graines de *Tephrosia purpurea* traitées par DIC (5.6 bars ; 61 s ; 22%) à 353 K.

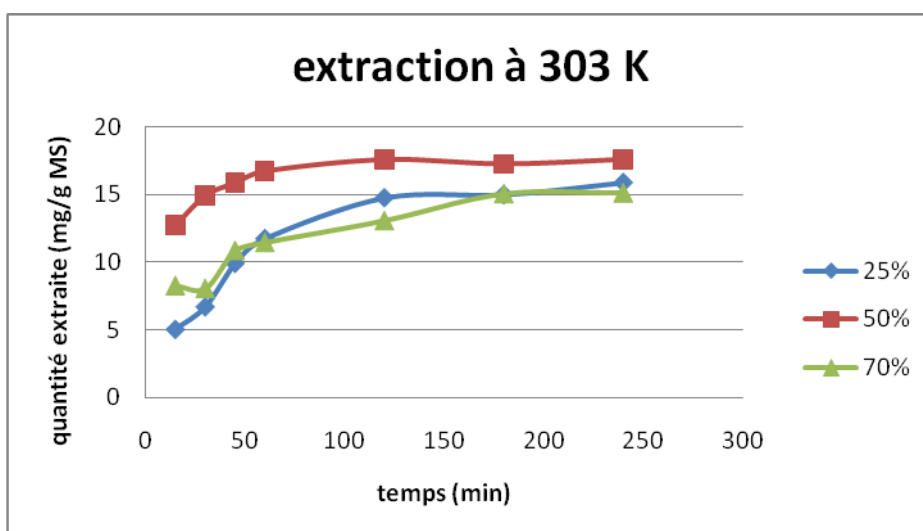


Figure III-56: effet du solvant sur l'extraction du stachyose à partir de graines de *Tephrosia purpurea* traitées par DIC (5.6 bars ; 61 s ; 22%) à 303 K

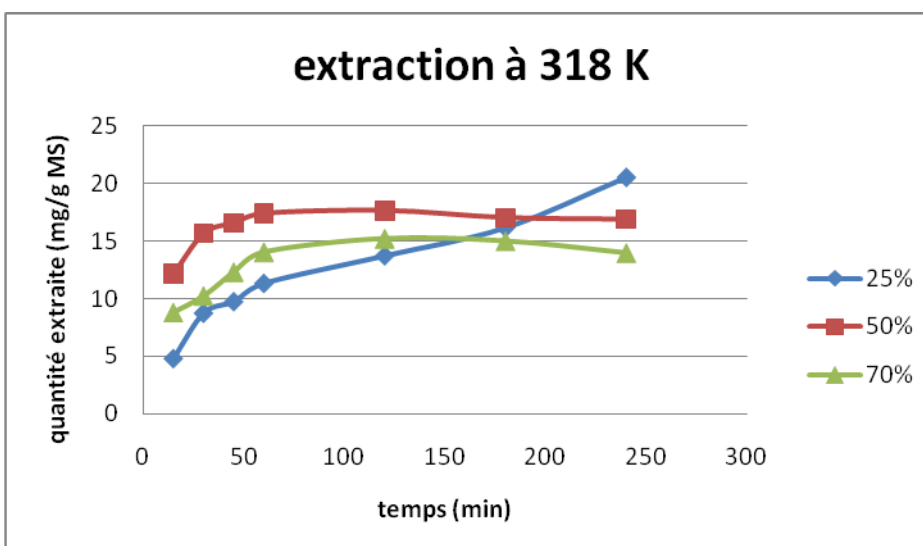


Figure III-57 : effet du solvant sur l'extraction du stachyose à partir de graines de *Tephrosia purpurea* traitées par DIC (5.6 bars ; 61 s ; 22%) à 318 K.

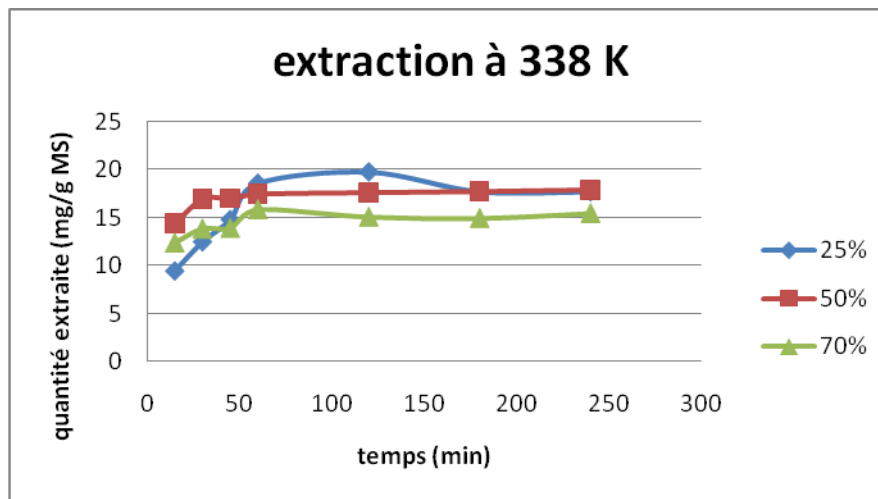


Figure III-58 : effet du solvant sur l'extraction du stachyose à partir de graines de *Tephrosia purpurea* traitées par DIC (5.6 bars ; 61 s ; 22%) à 338 K.

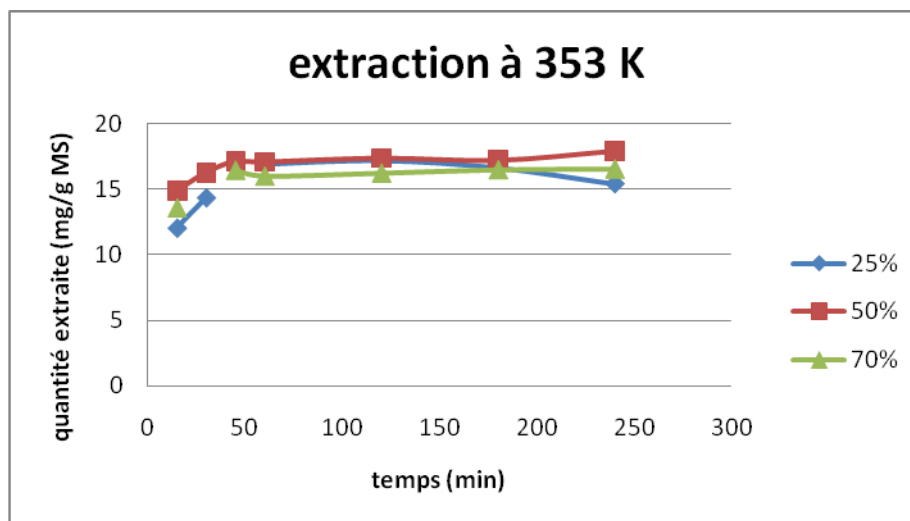


Figure III-59 : effet du solvant sur l'extraction du stachyose à partir de graines de *Tephrosia purpurea* traitées par DIC (5.6 bars ; 61 s ; 22%) à 353 K.

CHAPITRE III-4.

TESTS BIOLOGIQUES

Les recherches entreprises par le laboratoire Innovation Actifs sur l'activité biologique de l'extrait de *Tephrosia purpurea* ont permis de découvrir une activité de stimulation puissante de l'enzyme adénylate cyclase. Cette enzyme transforme l'ATP en AMPc et pyrophosphate. Grâce à cette activité, l'extrait de *Tephrosia purpurea*, est précieux pour une application en cosmétique ou en pharmacie, notamment en dermatologie, dans une activité d'amincissement corporel, dans une activité anti-inflammatoire, dans une activité pigmentante par action sur les mélanocytes et une activité antiveillessement (André, Darnault et al. 1995).

Plusieurs travaux ont été menés sur cet extrait :

D'une part, la corrélation de l'activité biologique à une famille moléculaire contenue dans l'extrait. Cette phase a nécessité la réalisation de différentes techniques d'identification structurale pour caractériser la fraction active.

D'autre part, la caractérisation et la quantification des polysaccharides contenus dans l'extrait.

Les tests en biologie cutanée, ont montré que le cicérol semble être une molécule très intéressante dans la thématique « peaux sensibles ». Toutefois, ce n'est pas la seule molécule de l'extrait impliquée dans cette thématique. Le stachyose semble aussi jouer un rôle important.

Ainsi, l'objectif de ce chapitre est, après avoir amélioré le rendement en ces deux marqueurs impliqué dans cette activité, de comparer l'activité biologique de l'extrait de graines de *Tephrosia purpurea* non traitées par DIC, avec l'activité d'extraits à partir de graines différemment traitées par DIC.

Les différents tests ont été réalisés sur un extrait de graines broyées de *Tephrosia purpurea* non traitées par DIC (MP), et des graines réhumidifiées à 22% et traitées par DIC selon les conditions :

P= 5.4 bars ; t=61 s (point 2)

P= 2.6 bars ; t=209 s (point 3)

P= 6 bars ; t= 135 s (point 7)

III-4.1. MESURE DE CYTOTOXICITE : TEST XTT

Avant de pouvoir mesurer l'influence de l'extrait sur les cellules immortalisées, une étape de mesure de sa cytotoxicité est nécessaire afin de connaître la dose à utiliser.

Le test a été réalisé selon la procédure décrite dans le paragraphe III.2.3.b

Les résultats sont exprimés en :

$$\% \text{ viabilité} = \frac{\text{absorbance} - \text{essai}}{\text{absorbance} - \text{témoin}} * 100$$

L'absorbance mesurée pour le témoin solvant DMSO servant de 100% de viabilité.

La limite non cytotoxique correspond à la concentration à partir de laquelle l'échantillon permet d'avoir un pourcentage de viabilité de 80 % (toutes les cellules sont vivantes ou alors il y'a stimulation de la croissance cellulaire dans le cas ou on a plus de 100%)

Le pourcentage de viabilité de l'échantillon de cellules aux différentes concentrations d'extrait est représenté pour les différents extraits testés (Figure III-60, Figure III-61, Figure III-62 and Figure III-63)

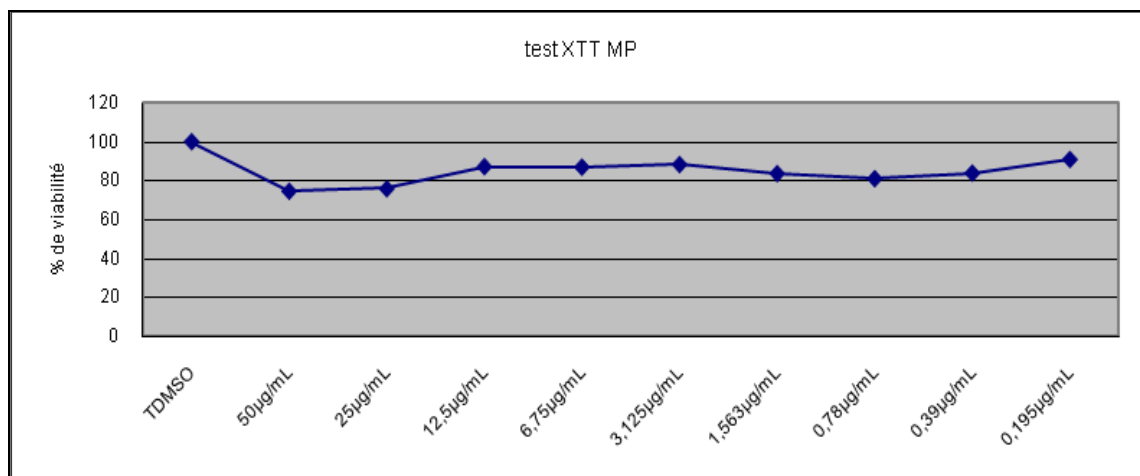


Figure III-60 : % de viabilité des cellules en fonction de la concentration de l'extrait MP.

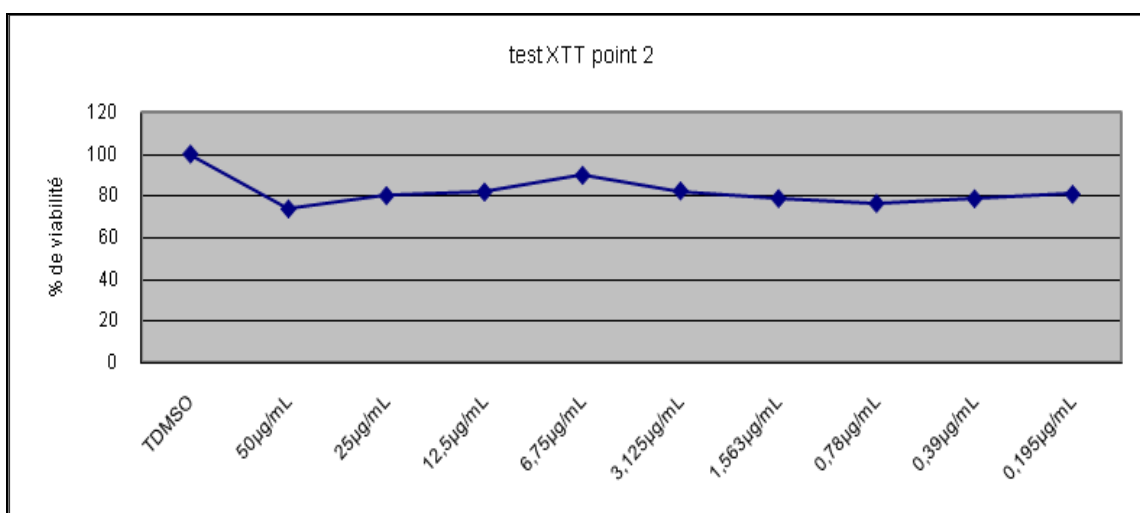


Figure III-61 : % de viabilité des cellules en fonction de la concentration de l'extrait point 2.

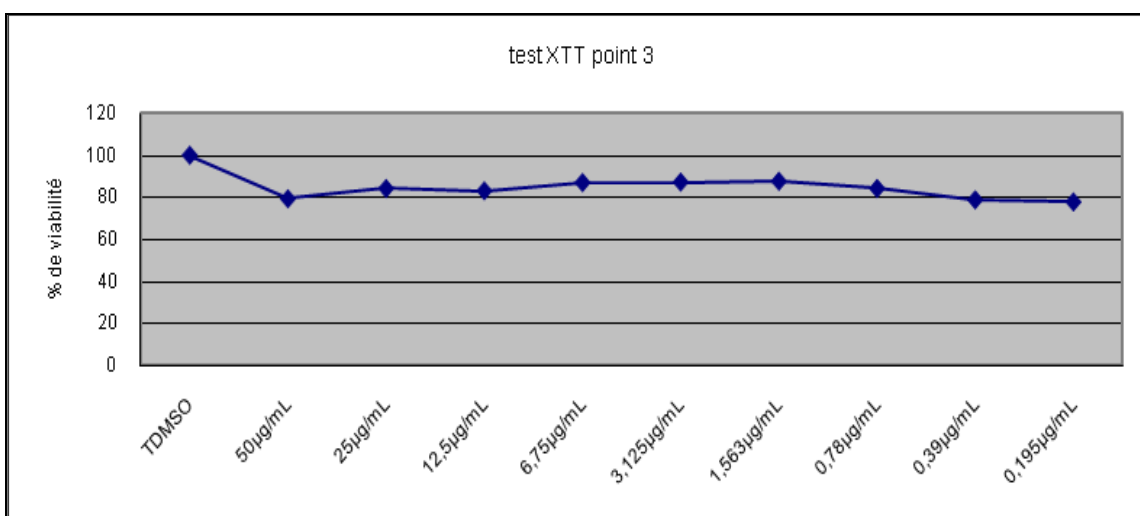


Figure III-62 : % de viabilité des cellules en fonction de la concentration de l'extrait point 3.

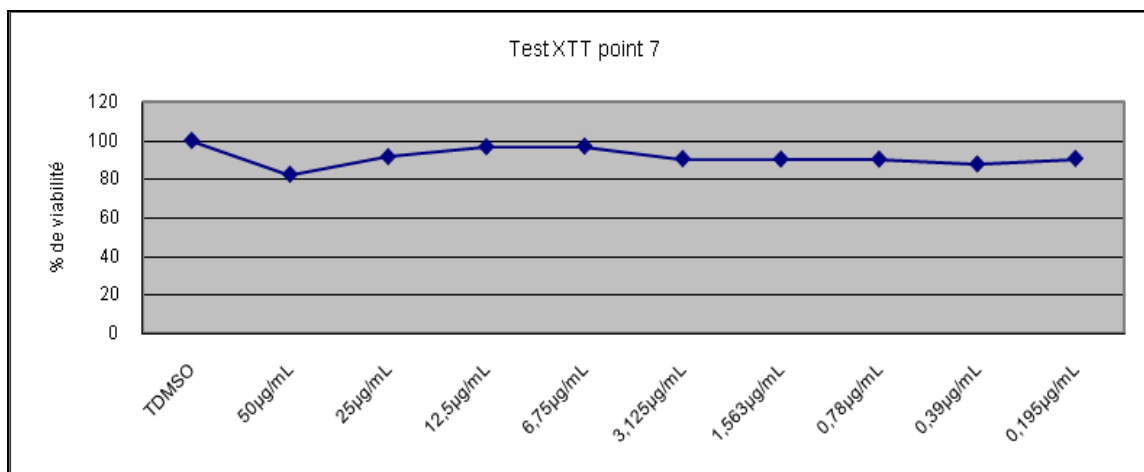


Figure III-63 : % de viabilité des cellules en fonction de la concentration de l'extrait point 7.

On peut considérer d'après les résultats pour les différents points que la limite cytotoxique de l'extrait est 25 µg/ml.

III-4.2. TEST AU BCA

Le test BCA peut être réalisé afin de confirmer les résultats obtenus par le test XTT. Les graphes du test BCA représentent le pourcentage de protéines totales en fonction de la concentration des extraits.

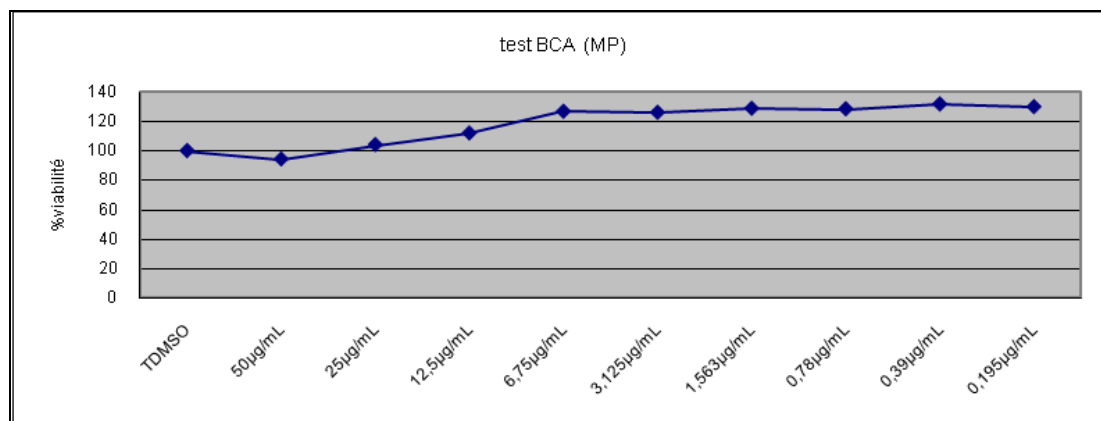


Figure III-64 : test BCA pour la matière non traitée par DIC (MP)

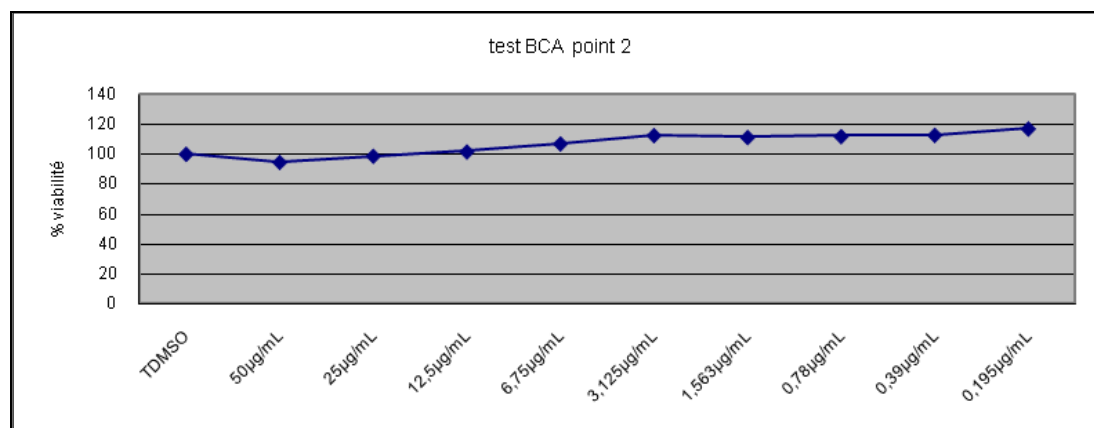


Figure III-65 : test BCA point 2

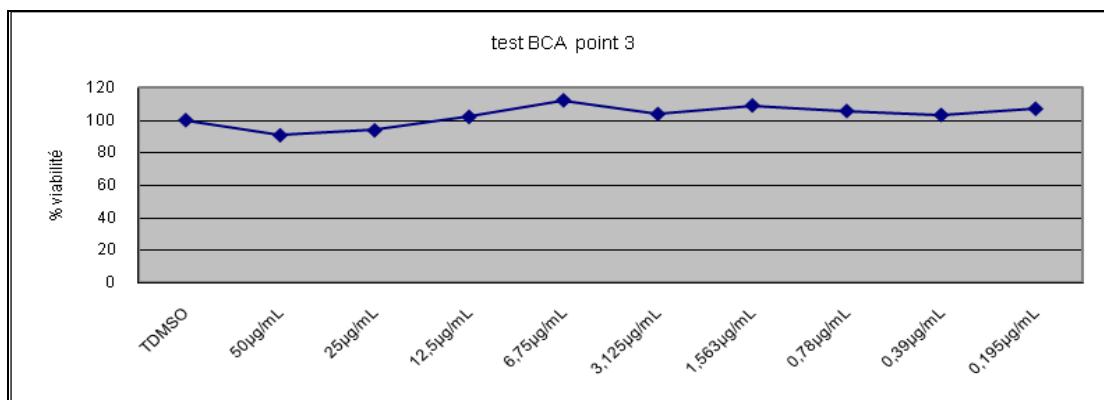


Figure III-66 : test BCA point 3

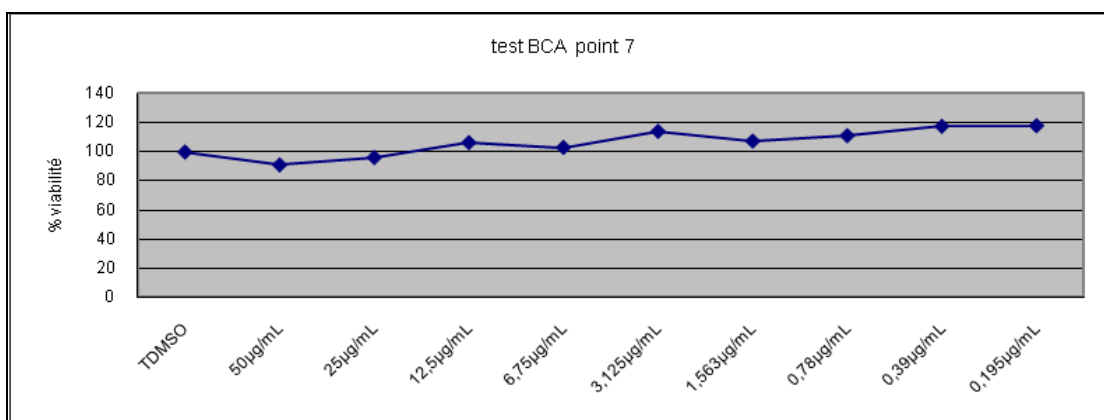


Figure III-67 : test BCA point 7

Les résultats de ce test, pour les différents points confirment l'absence de cytotoxicité de l'extrait à la dose choisie.

III-4.3. DOSAGE DES AMP_c

Certaines substances servent de messenger intracellulaire et, de par ce fait, sont des constituants cellulaires essentiels qui adaptent le fonctionnement des cellules aux besoins de l'organisme. Parmi ces messagers, l'on trouve l'adenosine 3',5' qui est un monophosphate cyclique (AMP_c). Le métabolisme de cette molécule se fait à partir de l'adenosine 3',5'-triphosphate grâce à une enzyme appelée l'adénylate cyclase.

Le principe réactionnel est le suivant :



Le milieu de culture après contact avec les adipocytes humains normaux est récupéré après 48 heures de traitement puis congelé jusqu'au dosage. Les cellules sont traitées par les différents extraits à la concentration finale de 25µg/ml.

L'AMP_c formé est dosé par un test ELISA (NEOGEN, ref : 403110). En considérant l'activité basale, c'est-à-dire sans effecteur, comme étant de 100 %, on pourra déterminer l'influence d'un effecteur sur le système enzymatique. Si l'activité est supérieure à 100 %, il sera mis en évidence un effet activateur de l'adénylate cyclase et, si l'activité est inférieure à 100 %, il sera mis en évidence au contraire un effet inhibiteur.

Les résultats du test de dosage de l'AMP_c est donnée par le Tableau III-26:

Tableau III-26 : résultats du dosage e l'AMPC pour le témoin et les points de DIC (2, 3 et 7)

	Témoin non traité	MP	3	7	2
AMPC (ng / mg de prot.)	1,66	2,01	1,95	1,68	2,13
AMPC (ng / mg de prot.)	1,58	2,11	1,92	1,72	2,18
AMPC (ng / mg de prot.)	1,62	1,98	1,87	1,62	2,14
Moyenne	1,62	2,03	1,91	1,67	2,15
ecart type	0,0327	0,0556	0,0330	0,0411	0,0216
% production	100	126	118	103	133
Student / témoin		0,00082	0,00087	0,22412	0,00004
		S	S	NS	S
Student / Total			0,06	0,00	0,05
			NS	NS	S

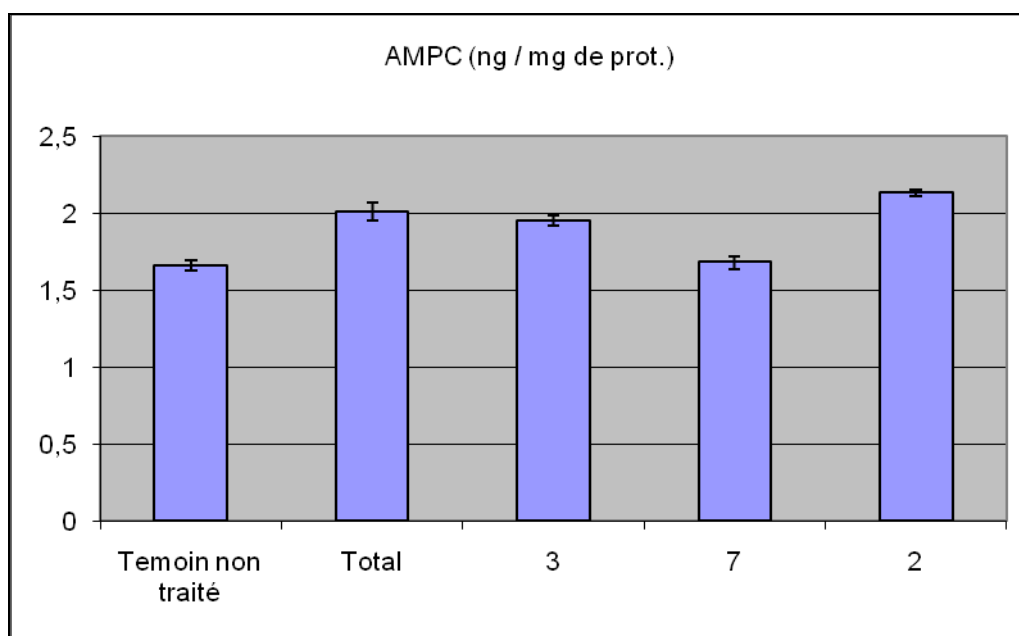


Figure III-68 : résultats du dosage d'AMPC

On remarque, d'après le Tableau III-26, que l'extrait a une action stimulante de la production d'AMPC, seul le point 7, en comparaison avec le standard, n'a pas d'effet significatif sur la stimulation de production d'AMPC.

En comparaison avec l'extrait de matière première, seul le point 2 possède une action de stimulation de la production de l'AMPC plus marquée.

Les résultats ne montrent pas de réelles différences par rapport à l'extrait "standard". Il y a 2 hypothèses:

- le système cellulaire ne répond pas de façon linéaire à des concentrations de cicérol.
- On a atteint un plateau (phénomène de retro inhibition) : la cellule produit suffisamment d'AMPC, elle n'a pas besoin d'en produire plus et donc elle arrête sa synthèse. A cause de ce phénomène, il nous est impossible de voir les différences de stimulation entre les différents extraits. Il serait donc intéressant d'envisager de faire les tests en partant de concentrations très faibles, par exemple la dose minimale qui permettrait de stimuler l'enzyme, et ainsi l'action de stimulation des différents extraits serait plus perceptible.

Tableau III-27 : résultats test XTT pour point 3.

	TDMSO	50µg/ml	25µg/ml	12,5µg/ml	6,75µg/ml	3,125µg/ml	1,563µg/ml	0,78µg/ml	0,39µg/ml	0,195µg/ml
	0,3363	0,1947	0,2656	0,2866	0,3052	0,3016	0,2928	0,2865	0,239	0,2832
	0,2542	0,22	0,2068	0,2296	0,2509	0,2335	0,1998	0,1752	0,2218	0,2798
	0,3083	0,2308	0,2265	0,2573	0,2045	0,219	0,2228	0,2097	0,2012	0,2337
	0,2904	0,2256	0,1843	0,2486	0,2285	0,2512	0,2454	0,2604	0,2784	0,2807
	0,2927	0,221	0,24	0,2427	0,2636	0,2747	0,261	0,2415	0,2588	0,2514
	0,2867	0,231	0,222	0,279	0,2875	0,2836	0,2605	0,2632	0,2872	0,2802
moyenn e	0,2947 67	0,2205 17	0,2242	0,2573	0,2567	0,2606	0,24705	0,23941 7	0,24773 3	0,268167
écart- type	0,0269 9	0,0134 8	0,0278 15	0,02184 3	0,03715 4	0,031503	0,032533	0,04058 1	0,03327 1	0,020651
viabilité %	100	74,810 58	76,060 16	87,2893 8	87,0858 3	88,40891	83,81205	81,2224 4	84,0438 8	90,97591

Tableau III-28 : résultats test XTT pour point 3.

	TDMSO	50µg/ml	25µg/ml	12,5µg/ml	6,75µg/ml	3,125µg/ml	1,563µg/ml	0,78µg/ml	0,39µg/ml	0,195µg/ml
	0,2376	0,1888	0,212	0,2104	0,2497	0,2265	0,1841	0,2275	0,2221	0,2083
	0,2659	0,1625	0,1798	0,2054	0,1969	0,1894	0,1946	0,1795	0,1806	0,187
	0,256	0,1937	0,2092	0,2083	0,2571	0,2044	0,1824	0,1792	0,1716	0,1882
	0,2581	0,1845	0,2021	0,2029	0,2245	0,2043	0,2137	0,1933	0,2122	0,2205
	0,2646	0,2119	0,2218	0,2191	0,2329	0,2377	0,2301	0,2022	0,2146	0,226
	0,2669	0,2063	0,2197	0,226	0,2326	0,217	0,2191	0,2064	0,2211	0,2249
moyenn e	0,2581 83	0,1912 83	0,2074 33	0,21201 7	0,23228 3	0,213217	0,204	0,19801 7	0,2037	0,20915
écart- type	0,0110 01	0,0175 33	0,0153 16	0,00882 1	0,02112 9	0,017405	0,01977	0,01831	0,02189 2	0,017838
viabilité %	100	74,088 18	80,343 43	82,1186 5	89,9683 7	82,58344	79,01362	76,6961 5	78,8974 2	81,00833

Tableau III-29 : résultats test XTT pour point 3.

	TDMSO	50µg/ml	25µg/ml	12,5µg/ml	6,75µg/ml	3,125µg/ml	1,563µg/ml	0,78µg/ml	0,39µg/ml	0,195µg/ml
	0,2563	0,1844	0,2057	0,2147	0,1933	0,1953	0,2003	0,2422	0,1842	0,1859
	0,2463	0,1905	0,2578	0,2386	0,2619	0,256	0,2261	0,2434	0,2192	0,1886
	0,2688	0,2572	0,2064	0,2317	0,2557	0,2264	0,2505	0,2034	0,1997	0,1924
	0,2858	0,2034	0,2449	0,2406	0,2462	0,2824	0,2699	0,2331	0,2392	0,2461
	0,3261	0,257	0,2342	0,2207	0,2456	0,2516	0,2574	0,2376	0,2314	0,2378
	0,2826	0,2338	0,2575	0,2417	0,2499	0,2444	0,2589	0,2467	0,2439	0,2504
moyenn e	0,2776 5	0,2210 5	0,2344 17	0,23133 3	0,2421	0,242683	0,24385	0,2344	0,2196	0,216867
écart- type	0,0281 26	0,0327 1	0,0236 61	0,01127 8	0,02469 1	0,029487	0,025863	0,01591 3	0,02350 8	0,030899

viabilité %	10 0	79,6146 2	84,4288 4	83,3183 3	87,1961 1	87,4062 1	87,826 4	84,4228 3	79,0923 8	78,1079 3
----------------	---------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	-------------	--------------	--------------	--------------

Tableau III-30 : résultats test XTT pour point 7.

	TDMS O	50µg/m l	25µg/m l	12,5µg/ ml	6,75µg/ ml	3,125µg/ ml	1,563µg/ ml	0,78µg/ ml	0,39µg/ ml	0,195µg/ ml
	0,2177	0,1908	0,2106	0,2004	0,2205	0,2213	0,2299	0,2274	0,1987	0,2016
	0,2394	0,1874	0,2121	0,2111	0,2296	0,2071	0,1988	0,2139	0,1823	0,1824
	0,2338	0,1805	0,1946	0,2378	0,215	0,2149	0,2061	0,1985	0,2195	0,2284
	0,2471	0,1963	0,2269	0,2401	0,2519	0,1907	0,1972	0,1875	0,2035	0,2107
	0,2373	0,1944	0,2118	0,2261	0,2021	0,21	0,2094	0,2137	0,2079	0,2221
moyenn e	0,2350 6	0,1898 8	0,2112	0,2231	0,22382	0,2088	0,20828	0,2082	0,20238	0,20904
écart- type	0,0108 6	0,0062 58	0,0114 41	0,01712 7	0,01859 1	0,011461	0,013096	0,01544 3	0,01361 6	0,018119
viabilité %	100	80,779 38	89,849 4	94,9119 4	95,2182 4	88,82838	88,60716	88,5731 3	86,0971 7	88,93049

CHAPITRE III-5.

EFFET DE LA TEXTURATION PAR DIC SUR L'EXTRACTION DES ANTHOCYANES DE LA ROSELLE DE MALAISIE

III-5.1. RESUME DE L'ARTICLE

Dans cet article, il a été question dans un premier temps d'extraire, d'identifier et de quantifier les anthocyanes de la Roselle de Malaisie et, par la suite, d'étudier l'effet de deux paramètres opératoires de la DIC (pression et temps de traitement) sur l'extraction des anthocyanes de la Roselle de Malaisie. Etant donnée l'impossibilité de faire une réhumidification sur les calices de la Roselle (perte de la coloration donc des anthocyanes), nous n'avons pas retenu la teneur initiale en eau des calices comme paramètre de l'étude.

Dans le présent travail, nous avons eu à accorder une importance particulière aux travaux concernant l'identification tout développer et définir concernant les anthocyanes. Pour la quantification globale des anthocyanes, la méthode différentielle de pH a été utilisée.

Pour l'identification des anthocyanes individuelles, plusieurs essais préliminaires ont été effectués ; ils visaient l'optimisation de la séparation par HPLC et l'identification par Spectrométrie de Masse (SM). Conformément à la bibliographie, deux anthocyanes majoritaires ont été identifiées et quantifiées : la Delphinidine-3-Sambubioside et la Cyanidine-3-sambubioside.

Pour l'étude de l'effet des paramètres opératoires de la DIC, un plan d'expériences à deux paramètres a été établi donnant ainsi lieu à 11 points expérimentaux dont 3 répétitions au centre. Les calices traités selon les différentes conditions de DIC ont été comparés à des calices non traités par DIC. La cinétique d'extraction a été réalisée entre 30 s et 10 min.

L'étude de la cinétique d'extraction des anthocyanes a été réalisée à l'aide d'un modèle linéaire traduisant l'évolution de la quantité extraite normalisée en fonction du temps. La détermination de la pente de cette droite permet une estimation de la vitesse avec laquelle a lieu l'extraction. Cependant, vu la différence de valeur de la quantité maximale extraite d'un échantillon à l'autre et la grande augmentation de cette valeur pour des produits différemment traités par DIC par comparaison avec la matière première, la normalisation des résultats ne peut pas bien traduire l'effet réel de la cinétique ; elle en induit en effet, dans notre cas, une sous-estimation, à des degrés divers, pour les points différemment traités par DIC.

Pourtant, et malgré cette difficulté supplémentaire, on a remarqué, pour la plupart des points traités par DIC, que la valeur de la constante de cinétique est supérieure à celle de la matière première. Aussi, la diffusivité pour les différents points traités par DIC a été améliorée : elle varie de 2,77 à $3,67 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, valeur systématiquement supérieure à $2,51 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ obtenue pour la matière non traitée par DIC.

Il a été démontré l'effet positif de la DIC sur la cinétique et le rendement d'extraction des anthocyanes. En effet, la même quantité d'anthocyane a été obtenue au bout de 2 à 3 minutes au lieu de 10 min avec la matière non traitée, ce qui implique une capacité de traitement de 3 à 5 fois supérieure. De plus, avec la DIC une quantité plus importante d'anthocyanes a été obtenue en « fin de l'opération d'extraction » montrant ainsi l'effet positif de la DIC sur l'augmentation de la disponibilité de ces molécules. L'optimum en

quantité extraite pour les anthocyanes a été obtenu avec les conditions opératoires suivantes : pression de vapeur de traitement (0,18 MPa) ; temps de traitement (9 s).

Dans le domaine de variation des paramètres opératoires étudiés, et pour un intervalle de confiance de 5%, la pression de vapeur et le temps de traitement n'ont pas d'effet significatif. En effet, en l'absence de données thermodynamiques sur le comportement des anthocyanes à haute température on a choisi de travailler dans un domaine étroit de pression, ce qui a vraisemblablement contribué à masquer l'effet propre de l'évolution de ces paramètres opératoires.

Impact of texturing by DIC on solvent extraction of anthocyanins from Malaysian Roselle (*Hibiscus sabdariffa*).

BEN AMOR B., ALLAF K.

University of La Rochelle -Pole science and Technology, «Laboratory Mastering agro-industrial technologies LMTAI EA 3166»,
avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, FRANCE

III-5.2. ABSTRACT

We studied the effect of the thermo-mechanical DIC treatment on the extraction of Roselle anthocyanins. It was shown that the DIC treatment improved both kinetics and yield of extraction of anthocyanins from the Roselle calyces. The effective diffusivity ranged from 4.62 to $6.11 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ for DIC treated material against $4.19 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ for the raw material.

III-5.3. INTRODUCTION

Hibiscus sabdariffa, commonly known as Roselle or red Sorrel is widely grown in Central and West Africa and South-East Asia. The red and fleshy cup shaped calyces of the flower are consumed worldwide as a cold beverage or a hot drink. These extracts are also used in folk medicine against many complaints that include high blood pressure, liver disease and fever (Wang, Wang et al. 2000). The positive physiological effect of this plant extract could be related to the presence of anthocyanins with potent antioxidant activity.

Anthocyanins are one of the most important groups of water soluble pigments visible to the human eyes. They are responsible for many of the attractive colors, from scarlet to blue, of flowers, fruits, leaves and storage organs. Chemically, anthocyanins are flavonoids, and consequently based on a C15 skeleton with a chromane ring bearing a second aromatic ring B in position 2 (C6-C3-C6) and with one or more sugar molecules bonded at different hydroxylated positions of the basic structure. Glycosylation and acylation of the aglycone moieties by different sugars and acids at different positions account for the broad structural diversity of these pigments. *Hibiscus* anthocyanins were identified as having delphinidine-3-sambubioside (Dp-3-sam) (70 % of the anthocyanins) and cyanidine-3-sambubioside (Cyn-3-sam) as the major pigments, with delphinidine-3-glucoside (Dp-3-glu) and cyanidine-3-glucoside (Cyn-3-glu) as the minor ones (Bridle and Timberlake 1997; Frank, Janssen et al. 2005).

The vegetable materials contain generally small amount of high added value active solute. Extraction and purification of bioactive compounds from natural sources become very important for the utilization of phytochemicals in the preparation of dietary supplements or nutraceuticals, functional food ingredients and additives to food, pharmaceutical and cosmetic products. Extraction of anthocyanins is commonly carried out under cold conditions with methanol or ethanol containing a small amount of acid with the objective of obtaining the flavylium cation form, which is red and stable in a highly acid medium [24]. However, acid may cause partial hydrolysis of the acyl moieties in acylated anthocyanins, especially in anthocyanins acylated with dicarboxylic acids such as malonic acid.

The extraction kinetics implies multiple steps. However, the main part of the operation is limited by diffusion, because of the natural structure of the plant which opposes a resistance to any liquid penetration; then the process is very slow and solvent is, sometimes, choose in order to improve the diffusion. Similar considerations would intervene even with supercritical fluid as solvent. Some other recent alternative extraction methods (ultrasonification, microwaves...) are proposed in order to intensify transfer processes but they remain too costly techniques for scaling up.

For improving technological aptitude of raw material in terms of extraction, one may modify the initial structure by cutting, grinding, etc. In our laboratory, we proposed to carry out studies concerning the effect of structure expansion. In several cases, we proved that the higher the expansion rate, the better the diffusivity constant. So we applied a swelling operation using the well-known process of "Instantaneous Controlled Pressure Drop" DIC (Détente Instantanée Contrôlée), which was developed in our laboratory since some years (Allaf et al., 1989, Allaf et al., 1994). Firstly, this process was used for swell-drying various fruit and vegetable; it assures a high quality by improving the hydration kinetics and capacity. DIC treatment is based on fundamental studies concerning the thermodynamics of instantaneity (Allaf, 2002). It consists on a thermo-mechanical processing induced by subjecting the product to an abrupt transition from high steam pressure towards vacuum. This process is also used for the extraction of essential oils and other volatile molecules by instant autovaporization (Allaf et al., 1998); it allows the plant (seeds, fruit, flower, etc.) to get higher global diffusivity and improves the availability of some of its compounds.

The aim of this work is to study the impact of texturing by DIC treatment on the aqueous anthocyanins extraction, from the calyces of Roselle, in terms of comparative kinetics and yield for treated and untreated calyces of Roselle.

III-5.4. EXPERIMENTAL PROTOCOL

III-5.4.a. CHEMICALS AND STANDARDS

We got dried calyces of Roselle from Malaysia. The deionised water used for the extraction was prepared with a GFL Deioniser (Germany). Solvents used for extraction (ethanol, methanol) were purchased from Carlo Erba. Analytical grade sodium acetate trihydrate, potassium chloride and formic acid were purchased from Merk (Germany). Acetonitrile and water were of HPLC grade. Cyanidin-3-O-glucoside chloride and Delphinidin-3-O-glucoside chloride were obtained from Extrasynthese (Lyon, France).

III-5.4.b. MEASUREMENT OF MOISTURE CONTENT

The moisture content of the samples was done using the oven-dry method. 2g of each sample was placed in a glass and was dried for 24 hours at 105°C. The initial water content of the dried calyces of Roselle was 12.56 % DB.

III-5.4.c. DIC PROCESS

III-5.4.c.i. Experimental set up

The experimental set up was largely described (Allaf et al., 1998; (Louka and Allaf 2004). It is composed of three main elements (figure 1):

-  The processing vessel (1) where we place and treat the samples,
-  The vacuum system, which consists mainly of a vacuum tank (2) with a volume 130 times greater than the processing reactor, and an adequate vacuum

pump. The initial vacuum level was maintained at 50 kPa in all the experiments.

- ✚ A pneumatic valve (3) that assures the connection/separation between the vacuum tank and the processing vessel. It can be opened in less than 0.2 second, this ensure the abrupt instant pressure drop within the reactor

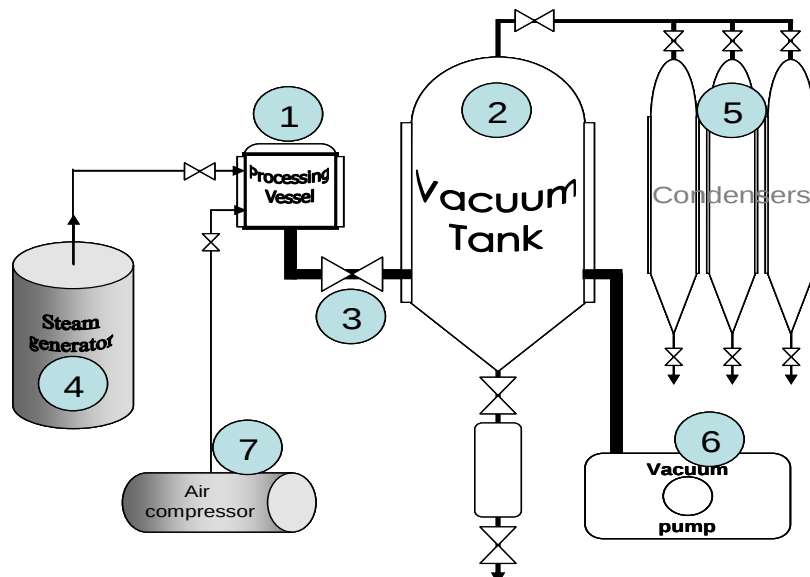


Figure III-69: Schematic diagram of the DIC reactor. 1: Processing vessel; 2: Vacuum tank; 3: Quick motion valve; 4: Steam generator; 5: condensers 6: Vacuum pump; 7: Air compressor.

III-5.4.c.ii. DIC treatment

Dried calyces of Roselle are firstly placed in the DIC treatment vessel; then we establish a first vacuum stage in this vessel in order to reduce the resistance vis-à-vis the steam diffusion as heating fluid through the plant material and consequently improve heat transfer. After closing the pneumatic valve of vacuum, steam under pressure was injected in the reactor and maintained for the treatment time. The thermal treatment is followed by an abrupt pressure drop towards vacuum. The resulting autovaporization induces an “instant” cooling of the treated material. After the treatment, the calyces of Roselle were recovered and ready for extraction.

III-5.4.d. EXPERIMENTAL DESIGN

For reducing the experimental points needed for carrying out the effects of the main operative parameters (steam pressure P and processing time t), we used a 2 variable central composite rotatable experimental design. In this case, this design needs 11 experiments with 3 repetitions for the central point. The experiments were run in random in order to minimize the effects of unexpected variability in the observed responses due to extraneous factors. The table 1 lists the independent variables and their level.

Table III-31: level of independent variables used in developing experimental data

Level	- α	-1	0	1	α
Processing pressure (bar)	0.7	0.9	1.4	1.8	2
Processing time (s)	5	9	18	26	30

α (axial distance) = $\sqrt[4]{N}$, N is the number of experiments of orthogonal design, i.e of the factorial design. In this case $\alpha = 1.4142$.

The responses were obtained by using the analysis design procedure of Statgraphics plus for Windows (1994-4.1 version). Table III-32 shows the factorial design matrix, with real parameters.

Table III-32: Experimental data of the composite central design

Experiment n°	Processing pressure (bar)	Processing time (s)
1	1.8	26
2	1.8	9
3	0.9	26
4	0.9	9
5	1.4	30
6	1.4	5
7	2	18
8	0.7	18
9	1.4	18
10	1.4	18
11	1.4	18

III-5.4.e. EXTRACTION OF ANTHOCYANINS

The water used as solvent was performed with stirring in a batch extractor. The batch extraction system used in this study was composed of a 250 ml round bottomed flask with a three-necked top, a magnetic stirrer and a boiler. The batch extractor was first filled with 200 ml of solvent. The content was heated to $100\pm 2^{\circ}\text{C}$ and then a pre-weighed amount of dried calyces of Roselle (2g) was added at time $t=0$. The flask temperature was controlled with a thermometer. At specific time intervals, samples of 3 ml of the solution were taken from the batch extractor and filtered with a $0.45\ \mu\text{m}$ syringe filter before analysis.

III-5.4.f. DETERMINATION OF TOTAL ANTHOCYANIN CONTENT

III-5.4.f.i. Calibration curve

UV-Vis spectrophotometer at 520 nm was used to determine the absorbance of acidified aqueous (1% HCl) solution of Dp-3-glu with concentration of 5, 10, 25 and 50 mg/l. Plotting concentration (mol/l) against absorbance, the molar absorption coefficient of Dp-3-glu was $27481\ \text{l.mol}^{-1}\text{.cm}^{-1}$.

III-5.4.f.ii. Quantification of total monomeric anthocyanins

Total monomeric anthocyanins content of Roselle dried calyces was determined using the pH differential method described by Guisti and Wrolstad, 2001. A Helios β UV/Visible spectrophotometer and 1 cm path length glass cells were used for spectral measurements at 520 and 700 nm respectively against distilled water as blank. For this purpose, aliquots of Roselle extract were brought to pH 1.0 and 4.5 and allowed to equilibrate for 20 min. The absorbance of each equilibrated solution was then measured at the wavelength of maximum absorption $\lambda_{\text{max}} = 520\ \text{nm}$ and $700\ \text{nm}$ for haze correction. The difference in absorbance values at pH 1.0 and 4.5 was directly proportional to total monomeric anthocyanin concentration which was calculated, based on delphinidin-3-glucoside (Dp-3-glu) with a molecular weight of $465.2\ \text{g/mol}$ and molar absorption coefficient of $27481\ \text{l.mol}^{-1}\text{.cm}^{-1}$. The pH measurements were done using a Denver Instrument company Model 15 pH-meter calibrated with pH 4, 7 and 10 buffers.

III-5.4.g. HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY; SAMPLE PREPARATION

Reference standard solutions for Dp-3-glu and Cyn-3-glu were prepared first. Dp-3-glu and Cyn-3-glu in 1% HCl in water were prepared with a concentration ranging between 5 and 100 mg/l. Linear regression analysis of data of peak area versus concentration was carried out. Linear calibration with accuracy of more than 99.5% was obtained for the two standards. .

III-5.4.g.i. HPLC-PDA

HPLC analysis was carried out on a 1100 Agilent High Performance Liquid Chromatography system (HPLC) equipped with a quaternary pump, an autosampler and a photodiode array detector (DAD) using a 250x4.6mm Kromasil (5µm) column (Chromoptic) and a security guard cartridge (Phenomenex). Column temperature was maintained at 40°C for best resolution and retention time stability. Compounds were separated by gradient elution using formic acid: water (10:90, v/v) (solvent A) and HPLC grade acetonitrile (solvent B) according to the following gradient: 0 min, 5% B; 20 min, 24% B followed by a post-run of 2 min. The solvent flow rate was 1ml/min. Detection was at 520 nm. Injection volume was 20µl.

III-5.4.g.ii. HPLC-MS

High-performance liquid chromatography (HPLC) (Agilent) coupled to photodiode array (PDA) detection and electrospray ion trap mass spectrometry (ESI-MS/MS) on a triple quadrupole instrument was used for the identification of the anthocyanins in the extracts prepared from calyces of Roselle. The MS parameters were as follows: positive mode; skimmer 1; dry gas (N₂) temperature, 350 °C; flow, 15 l/min; nebuliser, 60 psi; scan range *m/z* 100-800; the separations were performed on a 250*4.6 mm, 5*µm Kromasil column (Chromoptic). The mobile phase was: solvent A (water: acetic acid; 99:1, v/v) and solvent B acetonitrile at a flow rate of 0.5 ml/min and a linear gradient of A/B from 95:5 to 76:24 in 20 min, and then back to initial conditions.

III-5.4.h. DETERMINATION OF ANTHOCYANINS DIFFUSIVITY

The anthocyanins diffusivity was determined with the help of the following solution of the Fick's second law for diffusion from infinite flat plate (Crank 1975):

Équation III-8 :

$$y = \frac{Y_{\infty} - Y}{Y_{\infty} - Y_0} = \sum_1^{\infty} \frac{8}{(2i-1)^2 \pi^2} e^{-\frac{(2i-1)^2 \pi^2 D_{\text{eff}} t}{4l^2}}$$

Where y is the anthocyanins ratio; Y and Y_∞ are the amount of anthocyanins at time t and at equilibrium, Y₀ is the amount of anthocyanins corresponding to the surface anthocyanin quantity, eliminated at t=0 by convection, respectively D_{eff} is the effective diffusivity (m².s⁻¹) and l is the characteristic length (m), half thickness of the sample.

III-5.5. RESULTS AND DISCUSSION

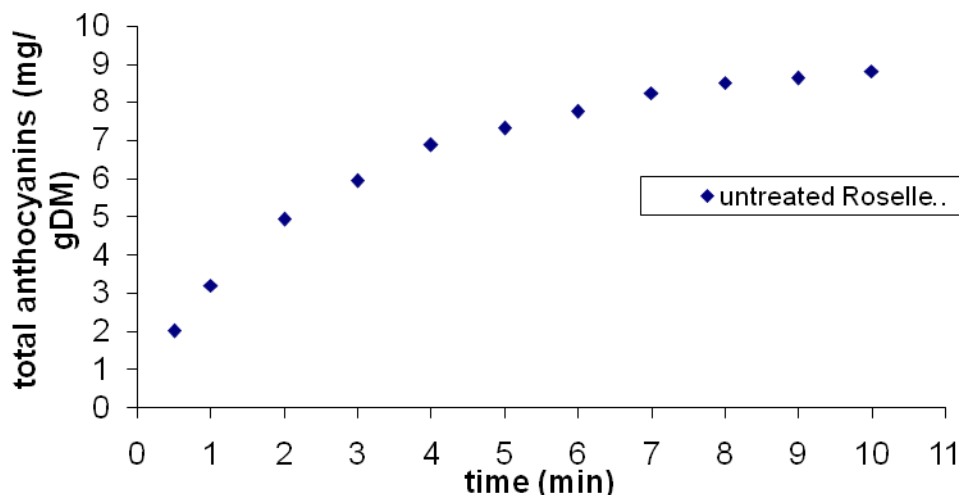
III-5.5.a. KINETICS OF EXTRACTION

III-5.5.a.i. Spectrophotometric investigation

Total anthocyanins were determined by using spectroscopic pH differential method (Giusti M. and Wrolstad R. E. 2001). For the untreated materials all the analysis were done in triplicate.

In order to carry out the extraction kinetics of anthocyanins from untreated calyces of Roselle with boiling water, the amount of Total Monomeric Anthocyanins extracted (TMA)

is plotted as a function of time. The plot shows that the amount of TMA rises and asymptotically approaches a limiting equilibrium concentration (Y_{∞}). The shape of this curve closely resembles those already published for similar infusion (Jaganyi and Price 1999).



FigureIII-70: kinetics of extraction of Total Monomeric Anthocyanins from untreated calyces of Roselle.

It was shown that the maximum of Total Monomeric Anthocyanins extracted from untreated calyces of Roselle is about 8.82 ± 0.23 mg/g of dried matter (DM). The comparison between the kinetics of extraction of anthocyanins from the untreated and the different DIC experiments shows that there is an improvement in the extraction kinetics for all the DIC experiments and that the maximum of Total Monomeric Anthocyanins extracted from dried calyces of Roselle is obtained within a short time (between 3 and 6 min) compared to untreated calyces (about 10 min). The Figure III-71: kinetics of extraction of TMA from untreated and DIC treated Roselle. shows the comparison between the kinetics of extraction of TMA from untreated calyces and DIC treated calyces according to experiment 2, 3 and 5. It appears clearly that for experiment 2 the same amount was obtained within 3 min compared to 10 min for untreated calyces.

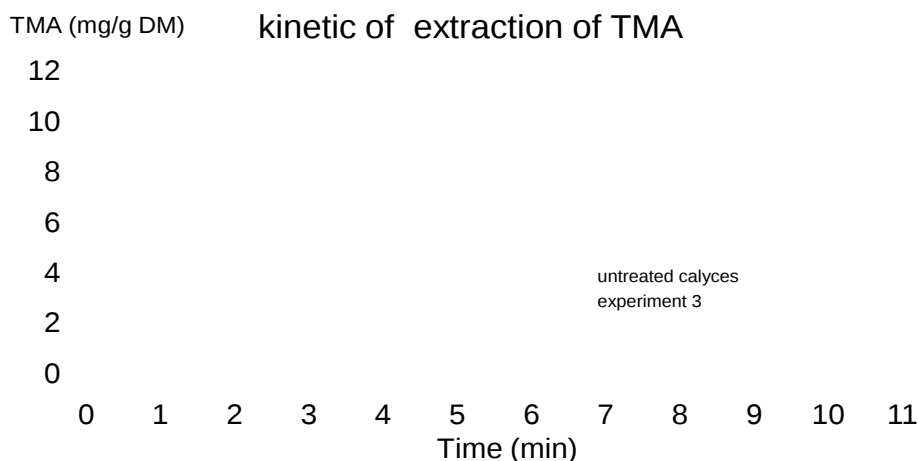


Figure III-71: kinetics of extraction of TMA from untreated and DIC treated Roselle.

The $10 \text{ min} Y_{\infty}$ value was used in the calculation of the observed rate constant (K_{obs}). For each run this value is different so we decided to consider a specific Y_{∞} value for each run.

The corrected values of Y_{∞} and Y , the amount of TMA at time t were fitted from Équation III-8 by getting the first approximation order into Équation III-8:

Équation III-9 :

$$\text{Ln} \frac{Y_{\infty} - Y}{(Y_{\infty} - Y_0)} = K_{\text{obs}} t$$

And the K_{obs} values were obtained by plotting the Ln function against time t . The resulting K_{obs} for the different runs obtained from the plot are shown in Table III-33. The first order plot for the raw material and from one DIC run can be seen in Figure III-72: first order plot for Anthocyanins extraction from DIC treated and untreated Roselle..

The theory through the previous equation suggests that the line should pass through the origin. This was not the case as seen in the first order plots presented in Figure III-72: first order plot for Anthocyanins extraction from DIC treated and untreated Roselle. , as has been reported in many other situations (Price and Spitzer 1994; Spiro and Lam 1995; Jaganyi and Mdletshe 2000; Jaganyi and Wheeler 2003) where a semi intercept (a) was found in each instance. These workers postulate that the intercept is affected by the loss of solubles, the material structure and its uptake of water in the beginning of the infusion process. Price and Spitzer, 1994 suggest that the intercepts serve as indicators of the quality of the data and deviation from the model employed. Note that an intercept of $a = 0.5$ implies that about 25% of the soluble component is present in the solution at $t=0$.

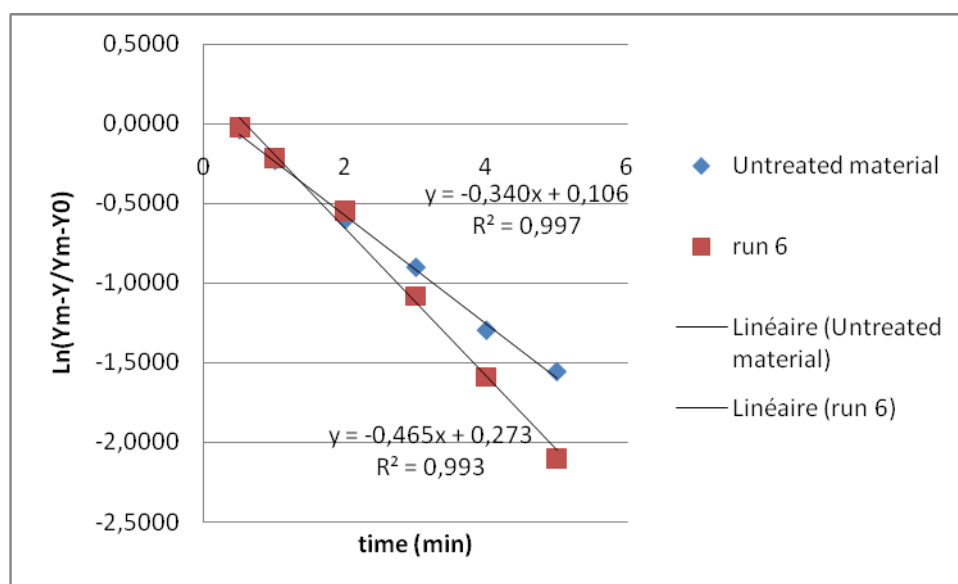


Figure III-72: first order plot for Anthocyanins extraction from DIC treated and untreated Roselle.

Table III-33: Values of K_{obs} , a and $t_{1/2}$ for the different DIC treated and non treated material

run	Pressure (Bar)	Processing time (s)	Kobs (10^{-2} s^{-1})	Y_0	Y_{∞}
1	1.8	26	41,60	1,99	10,76
2	1.8	9	37,50	2,70	11,91
3	0.9	26	45,80	2,91	11,75
4	0.9	9	39,50	1,50	10,48
5	1.4	30	40,50	2,42	11,83

6	1.4	5	46,50	1,68	10,90
7	2	18	38,00	2,44	9,08
8	0.7	18	43,00	1,93	9,82
9	1.4	18	38,00	1,36	10,76
10	1.4	18	44,80	2,24	10,96
11	1.4	18	49,60	1,74	11,09
RM	-	-	34,00	1,74	8.82±0.23

We can see that for all DIC treated material; we have K_{obs} values higher than that obtained from untreated material. In order to better compare the different curves which have different Y_{∞} , we choose to add another parameter which is the slope of curve (dc/dt). It was shown that for almost DIC treated material the slope is more important showing a faster extraction.

Solutions for Fik's second law are used to determine D_{eff} assuming that D_{eff} is constant with the concentration. y is defined as the ratio between anthocyanins amount at time, t and the initial anthocyanins amount of the solid matrix. For an infinite slab, the solution used is the following:

Équation III-10
$$y = \frac{Y_{\infty} - Y}{Y_{\infty} - Y_0} = \sum \frac{8}{(2i-1)^2 \pi^2} e^{-\frac{(2i-1)^2 \pi^2 D_{eff} t}{4l^2}}$$

It's generally assumed that, for extraction from plant matrixes where external resistance is negligible, the first term of the series solution can be used with little error (Schwartzberg and Chao 1982). Consequently, when the logarithm of Y is plotted against time, a straight line should be obtained and the diffusivity can be assessed from its slope.

Équation III-11
$$\ln Y = \ln \frac{8}{\pi^2} - \frac{\pi^2 D_{eff}}{4l^2} t$$

Table III-33 Table III-34 showed the D_{eff} values for the raw material and the different DIC treated material.

Table III-34: Anthocyanin effective diffusivity (m^2/s) for raw untreated and DIC treated material.

Run	Pressure (Bar)	Processing time (s)	D_{eff} ($10^{-11} m^2.s^{-1}$)
1	1.8	26	5,13
2	1.8	9	4,62
3	0.9	26	5,64
4	0.9	9	4,87
5	1.4	30	4,99
6	1.4	5	5,73
7	2	18	4,68
8	0.7	18	5,30
9	1.4	18	4,68
10	1.4	18	5,52
11	1.4	18	6,11
RM	-	-	4,19

As seen in Table III-34, the diffusivity is generally increased with the DIC treatment compared to the raw material.

III-5.5.a.ii. HPLC analysis

ii.a. HPLC separation optimization

In this investigation anthocyanins were determined also with HPLC method. HPLC has many advantages because it allows anthocyanins to be determined separately. The quantification of individual Roselle anthocyanins was determined by HPLC using Cyn-3-glu and Dp-3-glu as standard.

ii.b. Linearity of the HPLC method

The selection of the HPLC conditions was guided by the requirement for obtaining chromatograms with better resolution of adjacent peaks within a short time of analysis. Mixtures of acetonitrile-water/formic acid and acetonitrile-water/phosphoric acid were tested. Under the optimal chromatographic conditions used in this study, the two calibration curves exhibited good linear regression as shown by Table III-35: calibration curve for Dp-3-glu and Cyn-3-glu.

Table III-35: calibration curve for Dp-3-glu and Cyn-3-glu.

Analyte	Retention time	Standard curve	R ²	Test range (mg/l)
Dp-3-glu	7.76	y=0.0162 x	0.9998	5-100
Cyn-3-glu	9.07	y=0.0149 x	1	5-100

y= peak area; x=amount of each compound injected; r²= correlation coefficient of regression.

ii.c. Identification of anthocyanins

Four anthocyanins had been identified by the preceding bibliographical work carried out on the calyces of *Hibiscus sabdariffa* including two majority species: Dp-3-Sam and Cy-3-Sam which present more than 85% of the total anthocyanins.

The anthocyanin profile from calyces of Roselle is shown by the HPLC-PDA chromatogram in figure 4. The HPLC profile of the aqueous extract of Roselle showed four anthocyanins peaks, which had the absorption maxima in the range of 510-530 nm. The major anthocyanin peaks were identified by their HPLC elution order, UV/Vis and mass spectrometric characteristics (Table III-36) from a comparison with the literature data.

Table III-36: chromatographic, spectroscopic, and mass spectrometric characteristics of the anthocyanins from calyces of Roselle obtained by HPLC-PDA and HPLC-MS

Peak number a	tr HPLC-PDA (min)	tr HPLC-MS (min)	λ_{max}	M+ (m/z)	MS/MS (m/z)	Compounds
1	7.3		274, 526	597	465/303	Delphinidin-3-sambubioside
2	8.9		278, 514	581	449/287	Cyanidin-3-sambubioside

a number according to the chromatograms shown in Figure III-73.

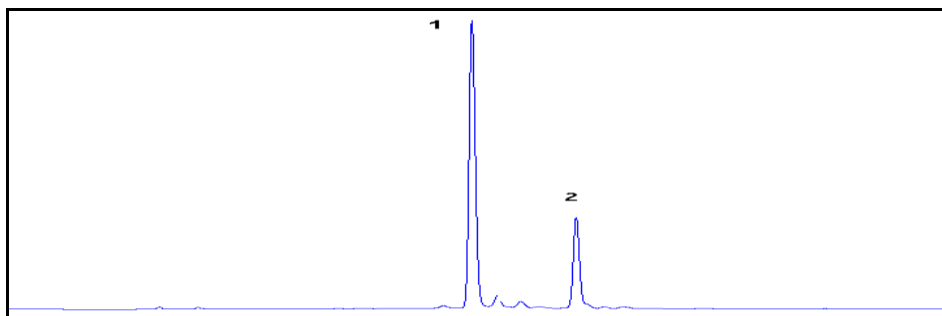


Figure III-73: Chromatogram obtained by HPLC-PDA, of the aqueous extract of anthocyanins from Roselle. Peak identification is given in Table III-36.

The HPLC-MS chromatogram of pic 1 showed the presence of three main fragment ions at (m/z) 597, 465 and a fragment with 303, which corresponds to the molecular ion of the delphinidin aglycone as a result of the loss of a hexose (162). The visible maximum absorbance wavelength ($\lambda_{\max}$) at 526 nm supported the identity of the anthocyanidin. These mass spectra indicated pic 1 as a delphinidin diglycoside.

A mass number of m/z 581 was found in the LC/MS spectrum of the pic 2, and a mass number of 449 and 287 were obtained in the MS/MS spectrum. It was expected that the m/z 287 corresponds to the molecular ion of the cyanidin aglycone and these mass spectra indicated pic 2 as a cyanidin diglycoside. According to these mass spectra, UV/Vis spectra and published data, the pic 1 and 2 were identified as Delphinidin-3-sambubioside and Cyanidin-3-sambubioside respectively (Figure III-74: chemical structures of the main anthocyanins of aqueous extract of Roselle.).

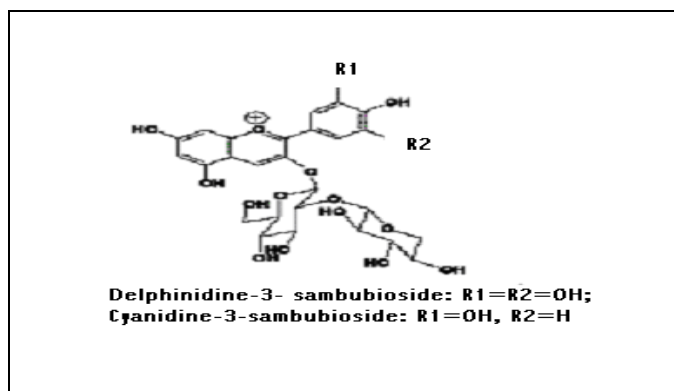


Figure III-74: chemical structures of the main anthocyanins of aqueous extract of Roselle.

ii.d. Kinetics of extraction of individual anthocyanins

The concentrations of different individual Roselle anthocyanins were determined by HPLC by comparing them to standard: Dp-3-sam was quantified using Dp-3-glu as standard and Cyn-3-sam with Cyn-3-glu as standard. The total anthocyanins according to HPLC method were determined as a sum of the two individual anthocyanins.

The kinetics of extraction of the Roselle anthocyanins (Dp-3-sam and Cyn-3-sam) from the untreated calyces of Roselle are presented in Figure III-75: kinetics of extraction of major anthocyanins of untreated Roselle.

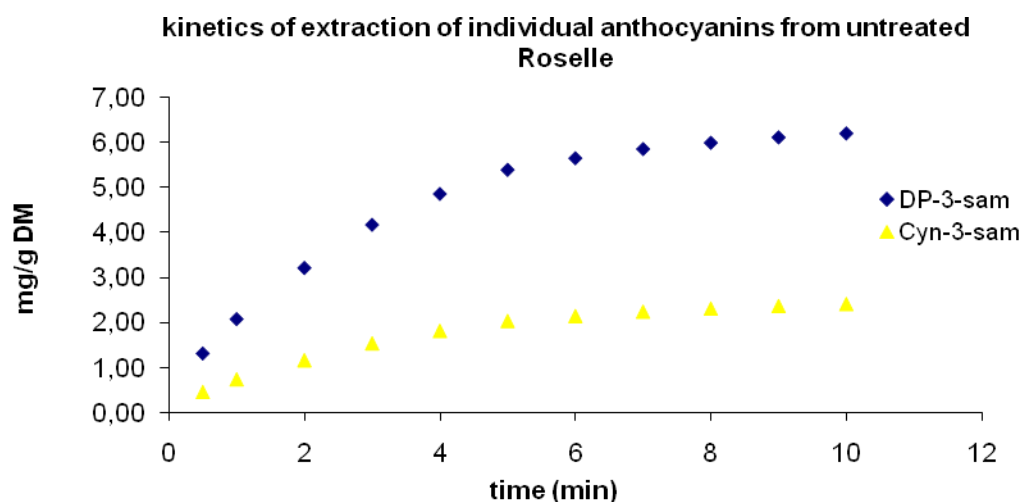


Figure III-75: kinetics of extraction of major anthocyanins of untreated Roselle

It was shown that the kinetics of extraction of each individual anthocyanins follow the same tendency as the TMA. In addition, Del-3-sam seems to be the major part of the Roselle anthocyanin (6.2 mg/ g DM) followed by Cyn-3-sam (2.4 mg/g DM). By comparing the extraction of these two molecules from untreated and treated Roselle calyces, one may notice an improvement in terms of kinetics and yield of extraction for about all the experiments. The Figure III-76: Comparison of kinetics of extraction of Dp-3-sam from untreated material and DIC treated Roselle calyces according to run 2 and 4. and Figure III-77 show a comparison between the kinetics of extraction of the major anthocyanins Del-3-sam and Cyn-3-sam respectively from untreated material and DIC experiment 2 and 4. It appears clearly that the DIC treatment improved the kinetics and the yield of extraction of these two molecules. As for the TMA, the same amount of Dp-3-sam is obtained within 3 minutes for DIC treated Roselle compared to 5 minutes for untreated calyces.

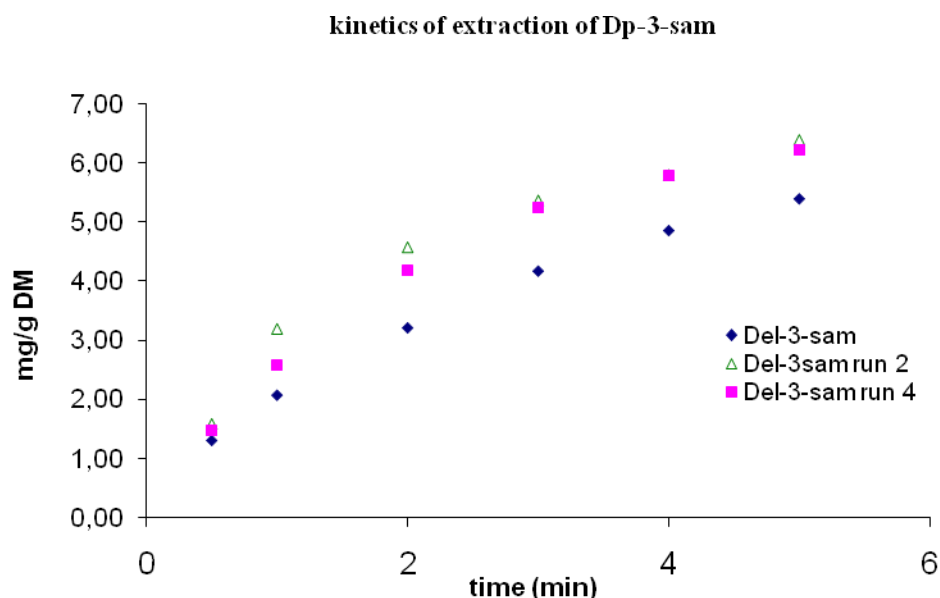


Figure III-76: Comparison of kinetics of extraction of Dp-3-sam from untreated material and DIC treated Roselle calyces according to run 2 and 4.

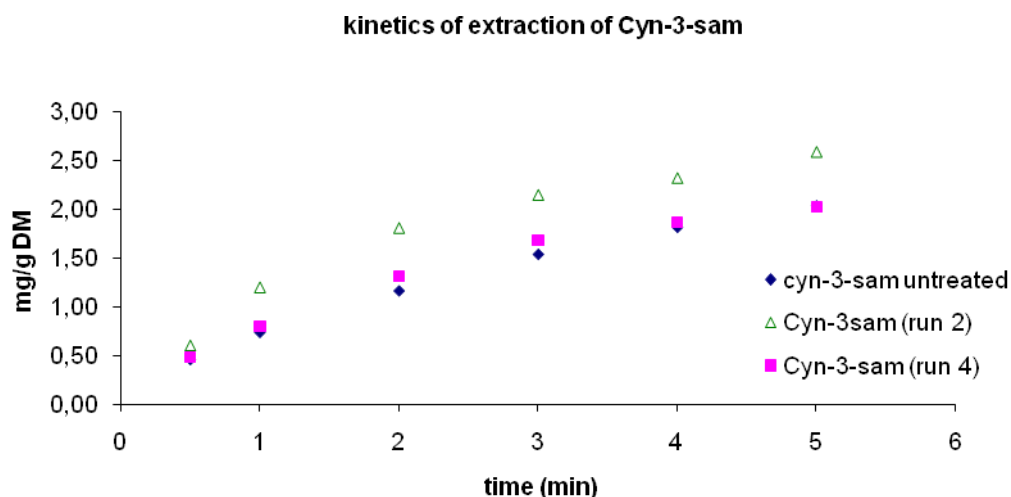


Figure III-77: Comparison of kinetics of extraction of Cyn-3-sam from untreated material and DIC treated Roselle calyces according to run 2 and 4.

III-5.5.b. STATISTICAL RESPONSES

The aim of this part was to study, by using the experimental design, the impact of the DIC on the yield of extraction of TMA and of each individual anthocyanin. The experimental responses in term of TMA, Dp-3-sam and Cyn-3-sam amount and the global extraction yield of these two molecules for the different combination in the experimental design are summarized in Table III-37.

Table III-37: TMA, Dp-3-sam and Cyn-3-sam amount, and relative percent of each individual anthocyanin of total anthocyanins determined by HPLC

run	Pressure (Bar)	Processing time (s)	TMA ^a	TMA (%) ^b	Dp-3-sama	Cyn-3-sama	Dp-3-sam (%) ^c	Cyn-3-sam (%) ^c
1	1.8	26	10.61	122	5.74	2.57	69	31
2	1.8	9	11.72	135	6.39	2.58	71	29
3	0.9	26	11.59	133	5.22	2.18	71	29
4	0.9	9	10.33	119	6.23	2.02	76	24
5	1.4	30	11.67	134	5.03	2.07	71	29
6	1.4	5	10.32	124	5.47	2.01	73	27
7	2	18	8.96	103	5.44	2.14	72	28
8	0.7	18	9.64	111	4.36	1.63	73	27
9	1.4	18	10.61	122	5.44	2.37	70	30
10	1.4	18	10.82	124	4.99	1.93	72	28
11	1.4	18	10.94	126	5.29	2.06	72	28
RM	-	-	8.82±0.23	100	5.39	2.03	73	27

a: mg/g DM; b: (TMA of treated material/TMA of untreated material)*100; c: reported to total anthocyanins by HPLC

Table III-37 shows that the main anthocyanins in Roselle extract were Dp-3-sam (69-76%) followed by Cyn-3-sam (24-31%). The same results were reported by (Bridle and Timberlake 1997; Frank, Janssen et al. 2005).

For treated Roselle, the content of TMA extracted varied from 8.96 to 11.72 mg/ g DM, Dp-3-sam content varied from 4.36 and 6.39 mg/g DM and Cyn-3-sam content varied from 1.63 to 2.58 mg/g DM. It's also showed that the anthocyanins extract from treated calyces of Roselle according to experiment 2 gave the highest amount of TMA, Dp-3-sam

and cyn-3sam with an improvement reaching respectively 135%, 119 and 127% compared to untreated Roselle.

III-5.5.b.i. Impact of parameters of DIC on the anthocyanins extraction

i.a. Statistical analyses

The table summarizes the results of the dependent variable studied here which is the TMA, Dp-3-sam and Cyn-3-sam and their coefficient of regression R^2 . Joeglekar and May, 1987 suggested that for a good fit of a model, R^2 should be at least 0.8. The R^2 values are 0.7521, 0.46 and 0.47 respectively and so are low, showing that a high proportion of variability was not explained by the model.

Table III-38: Regression coefficients, R^2 for TMA extraction by hot water from Roselle calyces

Regression coefficient	TMA
β_0	42.1516
β_1	112.779
β_2	0.561879
β^2_1	-31.1138
B12	-1.73808
β^2_2	
R^2	0.75

Table III-39: Regression coefficients, R^2 for TMA extraction by hot water from Roselle calyces

Regression coefficient	Dp-3-sam
β_0	6.76973
β_1	-0.3675
β_2	-0.15403
β^2_1	0.159128
B12	0.029255
β^2_2	0.002297
R^2	0.46

Table III-40: Regression coefficients, R^2 for TMA extraction by hot water from Roselle calyces

Regression coefficient	Cyn-3-sam
β_0	1.18753
β_1	0.896206
β_2	-0.0013037
β^2_1	-0.0905933
B12	-0.0115865
β^2_2	0.00057866
R^2	0.47

i.b. Effect of DIC parameters

The effect of the DIC parameters (pressure and time of treatment) on TMA, Dp-3-sam and Cyn-3-sam extraction are reported (Table III-38, Table III-39 and Table III-40) by the coefficient of the second order polynomials. Pareto chart, main effect of the parameters and response surface for TMA, Dp-3-sam and Cyn-3-sam extraction are shown in Figure III-78, Figure III-79 and Figure III-80.

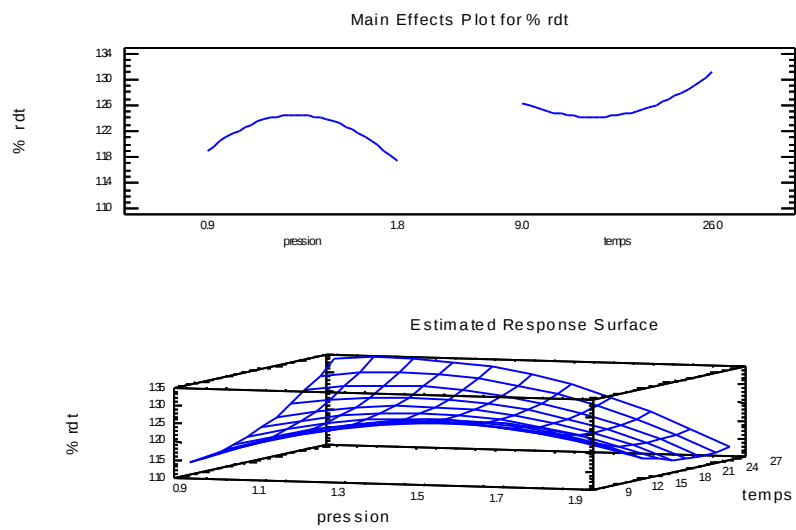


Figure III-78 : effect of DIC parameters on the TMA.

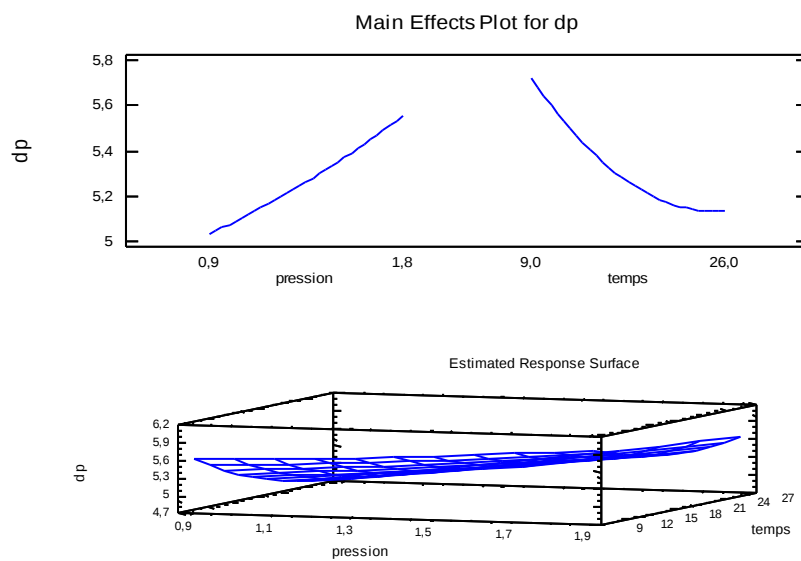
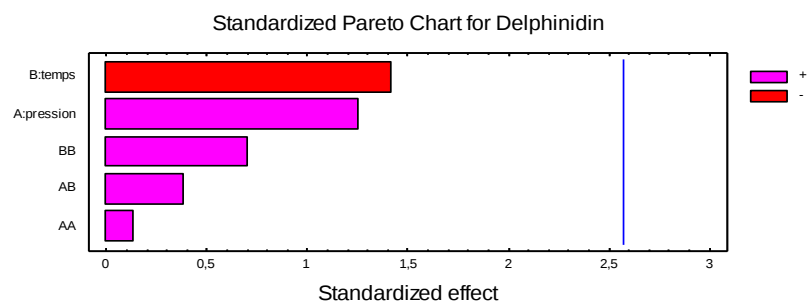


Figure III-79 : effect of DIC parameters on Dp-3-sam extraction

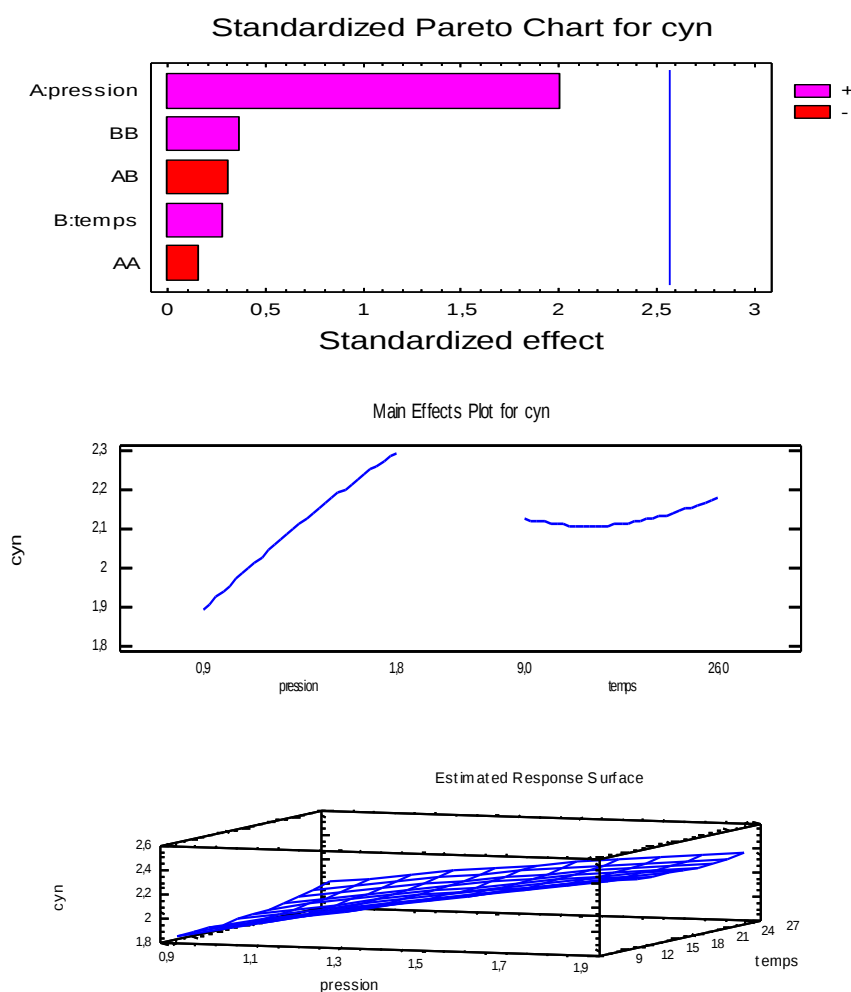


Figure III-80 : effect of DIC parameters on cyn-3-sam extraction

III-5.6. CONCLUSION

In conclusion, the data obtained in the present work have demonstrated that the DIC treatment has an impact on the kinetics and the yield of extraction of anthocyanins from the dried calyces of Roselle. Between the different combinations of the parameters of DIC, the experiment 2 (1.8 bars; 18s) have proved to be the best treatment giving an improvement of 130, 119 and 127% for TMA, Dp-3-sam and Cyn-3-sam respectively. For the anthocyanins effective diffusivity range from 4.62 to $6.11 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ for DIC treated material compared to $4.19 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ for the raw material.

III-5.7. REFERENCES

- Allaf K., P. Vidal, Gradient Activity Report N° CR/89/103, University of Technology of Compiègne, June, 1989.
- Allaf K., N. Louka, J.M. Bouvier, F. Parent, J.M. Forget, French Patent n° 9309720, International Extension PCT FR 94/00975 of, 1994.
- Allaf K., Thermodynamique des transformations instantanées, Proceedings of "L'école d'été de l'Université Libanaise". July 2002.

Allaf K., N. Louka, Z. Maache-Rezzoug, S.-A. Rezzoug, E. Debs-Louka, A. Habba Et G. Abraham. Brevet français n° 98 11106 issu de la demande N° FR 98/11106 du 04/09/98 sous priorité de la demande française N° 98/02032 du, 19/02/98 publiée le 20 Août, 1999 sous le n° 2 774 911.

Bridle, P. and C. F. Timberlake (1997). "Anthocyanins as natural food colours--selected aspects." Food Chemistry 58(1-2): 103-109.

Frank, T., M. Janssen, et al. (2005). "Pharmacokinetics of Anthocyanidin-3-Glycosides Following Consumption of *Hibiscus sabdariffa* L. Extract." The Journal of Clinical Pharmacology.

J Clin Pharmacol 45(2): 203-210.

Giusti M. and Wrolstad R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. NY, John Wiley & Sons.

Louka, N. and K. Allaf (2004). "Expansion ratio and color improvement of dried vegetables texturized by a new process "Controlled Sudden Decompression to the vacuum": Application to potatoes, carrots and onions." Journal of Food Engineering 65(2): 233-243.

Wang, C.-J., J.-M. Wang, et al. (2000). "Protective effect of *Hibiscus* anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats." Food and Chemical Toxicology 38(5): 411-416.

CHAPITRE III-6.

EFFET DE LA TEXTURATION PAR DIC SUR L'EXTRACTION DES ANTHOCYANES DE LA ROSELLE D'EGYPTE

III-6.1. RESUME DE L'ARTICLE

D'après les résultats de l'article 2, on a constaté que le domaine des variations des paramètres opératoires de la DIC choisi a été trop centré, c'est pour cette raison qu'on a choisi dans le présent travail d'élargir le domaine de variation de la pression et du temps de traitement par DIC.

Dans cet article, nous avons utilisé de la Roselle d'Egypte au lieu de celle de Malaisie. On s'est intéressé uniquement à la quantification globale des anthocyanes, au moyen de la méthode différentielle de pH.

L'effet des paramètres opératoires de la DIC a été analysé au moyen du logiciel STATGRAPHICS.

Il a été démontré que l'utilisation la DIC en tant que prétraitement avant l'extraction des anthocyanes, a contribué à l'amélioration du rendement d'extraction d'anthocyanes qui varie entre 104 et 145%, comparé à la matière première, selon les conditions DIC.

Les paramètres opératoires de DIC donnant le maximum de rendement sont les suivantes : pression de traitement (0.25 MPa) et temps de traitement (5s).

Dans le domaine de variations des paramètres opératoires, et pour un intervalle de confiance de 5%, les effets simples respectivement de la pression et du temps de traitement sont significatifs.

Plus la pression est élevée, plus le rendement est faible. Le même effet est observé pour le temps de traitement qui a un effet négatif sur la quantité d'anthocyanes extraites.

Improvement of anthocyanins extraction from *Hibiscus sabdariffa* by coupling solvent and DIC process

BEN AMOR bouthaina, ALLAF Karim

University of La Rochelle -Pole science and Technology, «Laboratory Mastering agro-industrial technologies LMTAI EA 3166», avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, FRANCE

III-6.2. SUMMARY

The aim of this study is to investigate the effect of the “Instantaneous Controlled Pressure Drop” DIC (Détente Instantanée Contrôlée) on the yield of extraction of Total Monomeric Anthocyanins from Egyptian *Hibiscus sabdariffa* calyces. It was concluded that the DIC has a positive effect on the yield of extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*. The optimized conditions of DIC were pressure of treatment 0.25 MPa and time of treatment 5 s giving an improvement of 145% for TMA.

Mots-clés : Anthocyanins, Extraction, DIC

III-6.3. INTRODUCTION

Hibiscus sabdariffa, commonly known as Roselle or red Sorrel is widely grown in Central and West Africa and South-East Asia. The red and fleshy cup shaped calyces of the flower are consumed worldwide as a cold beverage or a hot drink. These extracts are also used in folk medicine against many complaints that include high blood pressure, liver disease and fever (Wang, Wang et al. 2000). The positive physiological effect of this plant extract could be related to the presence of anthocyanins with potent antioxidant activity.

Anthocyanins are the most important group of water soluble pigments that, after chlorophyll, are visible to the human eyes. They are responsible for many of the attractive colours, from scarlet to blue, of flowers, fruits, leaves and storage organs. The vegetable materials contain generally only a small amount of active solute, but usually with high added value. The extraction and purification of bioactive compounds from natural sources become very important for the utilization of phytochemicals in the preparation of dietary supplements or nutraceuticals, functional food ingredients and additives to food, pharmaceutical and cosmetic products. Extraction of anthocyanins is commonly carried out under cold conditions with methanol or ethanol containing a small amount of acid with the objective of obtaining the flavylium cation form, which is red and stable in a highly acid medium. However, acid may cause partial hydrolysis of the acyl moieties in acylated anthocyanins, especially in anthocyanins acylated with dicarboxylic acids such as malonic acid.

The extraction kinetics implies multiple steps. However, the main part of the operation is limited by diffusion, because of the natural structure of the plant which opposes a resistance to the solvent penetration; process is then very slow and would need a big amount of solvent. Similar considerations would intervene when used solvent is supercritical fluid. Some other recent alternative extraction methods (ultrasonification, microwave...) are proposed in order to intensify transfer processes but they remain too costly techniques for scaling up.

For improving technological aptitude of raw material in terms of extraction, one may modify the initial structure by cutting, grinding, etc. In our laboratory, we proposed to carry

out studies concerning the effect of structure expansion. In several cases, we proved that the higher the expansion rate, the better the diffusivity constant. So we applied a swelling operation using the well-known process of “Instantaneous Controlled Pressure Drop” DIC (Détente Instantanée Contrôlée) which was developed in our laboratory since some years (Allaf et al., 1989, Allaf et al., 1994). Firstly, this process was used for swell-drying various fruit and vegetable food products; it assures a high quality by improving the hydration kinetics and capacity. DIC treatment is based on fundamental studies concerning the thermodynamics of instantaneity (Allaf, 2002). It consists on a thermo-mechanical processing induced by subjecting the product to an abrupt transition from high steam pressure towards vacuum. This process also used for the extraction by instant autovaporization of essential oils and other volatile molecules (Allaf et al., 1998), allows the product to get higher global diffusivity and improves the availability of some compounds in the treated plant.

The aim of this work is to study the impact of DIC treatment on the aqueous anthocyanins extraction, from the calyces of Roselle. A comparison between yield of extraction of anthocyanins from treated and untreated calyces of Roselle will be exposed.

III-6.4. EXPERIMENTAL PROTOCOL

III-6.4.a. RAW MATERIAL AND CHEMICALS

Dried calyces of Roselle were obtained from Egypt. The deionized water used for the extraction was prepared with a GFL Deioniser (Germany). Analytical grade Sodium acetate trihydrate and potassium chloride were purchased from Merk (Germany). Delphinidin-3-O-glucoside chloride was obtained from Extrasynthese (Lyon, France).

III-6.4.b. MEASUREMENT OF MOISTURE CONTENT

The moisture content of the samples was done using the oven-dry method which uses weight loss to obtain a direct measure of the moisture content of the samples. 2g of each sample was placed in a glass and was dried for 24 hours under an air flux at 105 °C. The initial water content of the dried calyces of Roselle was 14.87 % DB.

III-6.4.c. DIC PROCESS

III-6.4.c.i. Experimental set up

The experimental set up was largely described (Allaf et al., 1998; (Louka and Allaf 2004). It is composed of three main elements (Figure III-81):

- ✚ The processing vessel (1) where we place and treat the samples,
- ✚ The vacuum system, which consists mainly of a vacuum tank (2) with a volume 130 times greater than the processing reactor, and an adequate vacuum pump. The initial vacuum level was maintained at 50 kPa in all the experiments.
- ✚ A pneumatic valve (3) that assures the connection/separation between the vacuum tank and the processing vessel. It can be opened in less than 0.2 second, this ensure the abrupt instant pressure drop within the reactor

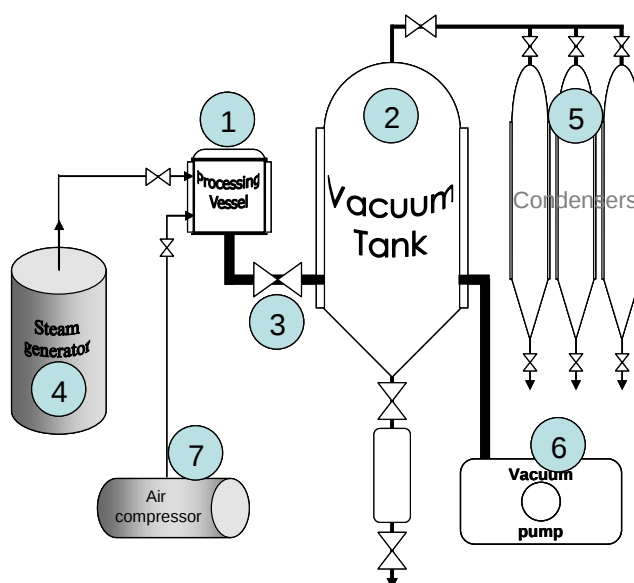


Figure III-81: Schematic diagram of the DIC reactor. 1: Processing vessel; 2: Vacuum tank; 3: Quick motion valve; 4: Steam generator; 5: condensers 6: Vacuum pump; 7: Air compressor.

III-6.4.c.ii. DIC treatment

Dried calyces of Roselle are firstly placed in the DIC treatment vessel; then we establish a first vacuum stage in this vessel in order to reduce the resistance toward the steam diffusion as heating fluid through the plant material and consequently improve heat transfer. After closing the pneumatic valve of vacuum, steam under pressure was injected in the reactor and maintained for the treatment time. The thermal treatment is followed by an abrupt pressure drop towards vacuum. The resulting autovaporization induces an “instant” cooling of the treated material. After the treatment, the calyces of Roselle were recovered and ready for extraction. The water content of each sample was determined before extraction.

III-6.4.d. EXPERIMENTAL DESIGN

In order to reduce the experimental points needed for carrying out the effects of the main operative parameters (steam pressure P and processing time t), we used a 2 variable central composite rotatable experimental design. This design needs 11 experiments with 3 repetitions for the central point. The experiments were run in random in order to minimize the effects of unexpected variability in the observed responses due to extraneous factors. The Table III-41 lists the independent variables and their level.

Table III-41: level of independent variables used in developing experimental data

Level	$-\alpha$	-1	0	1	$-\alpha$
Processing pressure (bar)	1	1.4	2.5	3.6	4
Processing time (s)	5	13	33	52	60

α (axial distance) = $\sqrt[4]{N}$, N is the number of experiments of orthogonal design, i.e of the factorial design. In our 2 parameter case, $\alpha = 1.4142$

The surface responses were obtained by using the analysis design procedure of Statgraphics plus for Windows (1994-4.1 version). Table III-42 shows the factorial design matrix, with coded variables.

Table III-42: Experimental data of the composite central design

Experiment n°	Processing pressure (bar)	Processing time (s)
1	3.6	52
2	3.6	13
3	1.4	52
4	1.4	13
5	2.5	60
6	2.5	5
7	4.0	33
8	1.0	33
9	2.5	33
10	2.5	33
11	2.5	33

III-6.4.e. EXTRACTION OF ANTHOCYANINS

The extraction of anthocyanins from the dried calyces of Roselle, with water as solvent was performed with stirring in a batch extractor. The batch extraction system used in this study was composed of a 250 ml round bottomed flask with a three-necked top, a magnetic stirrer and a boiler.

The batch extractor was first filled with solvent. The content was heated to $100 \pm 2^\circ\text{C}$ and then a pre-weighed amount of dried calyces of Roselle (2g) was added at time $t=0$. The flask temperature was controlled with a thermometer. At 10 min, 3 ml of the solution were taken from the batch extractor and filtered with a $0.45 \mu\text{m}$ syringe filter before analysis.

III-6.4.f. DETERMINATION OF TOTAL ANTHOCYANIN CONTENT

III-6.4.f.i. Calibration curve

UV-Vis spectrophotometer at 520 nm was used to determine the absorbance of acidified aqueous (1% HCl) solution of Dp-3-glu with concentration of 5, 10, 25 and 50 mg/l. Plotting concentration (mol/l) against absorbance, the molar absorption coefficient of Dp-3-glu was $27481 \text{ mol.l}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

III-6.4.f.ii. Quantification of total monomeric anthocyanins

Total monomeric anthocyanins content of Roselle dried calyces was determined using the pH differential method described by Guisti et Wrolstad, 2001. A Hélios UV/Visible spectrophotometer and 1 cm path length glass cells were used for spectral

measurements at 520 and 700 nm respectively against distilled water as blank. For this purpose, aliquots of Roselle extract were brought to pH 1.0 and 4.5 and allowed to equilibrate for 20 min. The absorbance of each equilibrated solution was then measured at the wavelength of maximum absorption $\lambda_{\max}$ and 700 nm for haze correction. The difference in absorbance values at pH 1.0 and 4.5 was directly proportional to Total Monomeric Anthocyanin concentration which was calculated, based on delphinidin-3-glucoside (Dp-3-glu) with a molecular weight of 465.2 g/mol and molar absorptivity of 27481 L/cm-mg. The pH measurements were done using a Denver Instrument company Model 15 pH-meter calibrated with pH 4, 7 and 10 buffers.

III-6.5. RESULTS AND DISCUSSION

III-6.5.a. YIELD OF EXTRACTION

This study aimed to identify the impact of the DIC treatment on the kinetics and total yield of extraction of Total Monomeric Anthocyanins (TMA) from the calyces of Roselle. The experimental response in term of TMA is summarized in Table III-43. By using DIC as pre-treatment, the extraction of TMA has been improved from 104 up to 145% compared to untreated calyces. The calyces treated by DIC at (Steam pressure P: 0.25 MPa; thermal treatment time: 5 s) gives the highest value of extracted TMA yield, which reaches up to 14.60 mg/ g DM, since the untreated calyces, gave only about 10.01 mg/g DM.

Table III-43: TMA from calyces of Roselle

Run	Steam Pressure (MPa)	Processing time (s)	TMA mg/g DM	TMA (%) ^a
1	0.36	52	6.62	66
2	0.36	13	10.49	104
3	0.14	52	12.06	120
4	0.14	13	12.73	126
5	0.25	60	9.11	90
6	0.25	5	14.60	145
7	0.40	33	5.16	51
8	0.10	33	14.43	143
9	0.25	33	10.50	104
10	0.25	33	9.59	95
11	0.25	33	10.51	104
Untreated material	-	-	10.09	-

^a: (TMA of treated material/TMA of untreated material)*100

III-6.5.b. STATISTICAL ANALYSES

The results concerning the evolution of TMA yield versus operative parameters of DIC allow us to get the following second order polynomial model:

$$TMA\ yield=13.0156+2.34406*P-0.0272833*t-0.705038*P^2-0.037296*P*t+0.000639539t^2.$$

The coefficient of regression we got is $R^2=85\%$; it shows that a high proportion of variability of TMA extraction versus the effects of the DIC parameters (steam pressure and thermal treatment time) is reported by this polynomial model, which is thus a relevant model; indeed, (Joglekar and May 1987) suggested that for a good fit of a model, R^2 should be at least 0.8.

III-6.5.c. EFFECT OF DIC PARAMETERS

Pareto chart, main effects plot of DIC parameters and response surface for TMA extraction are shown in Figure III-82, Figure III-83 and Figure III-84. The effect of a parameter is considered as statistically significant if the histogram cross the vertical line, translating the threshold of significance of 5%. So, according to the Figure III-82, and in the field of variation of the process parameters, the simple effect of pressure and time were statistically significant on the TMA content. Figure III-83, shows that the higher the steam pressure, the lower the TMA content. Similar results were obtained with the time which has a negative effect on the TMA content.

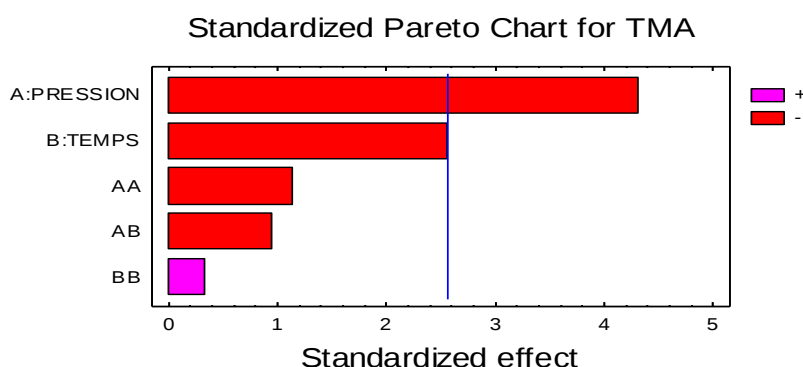


Figure III-82: Standardized Pareto chart for TMA

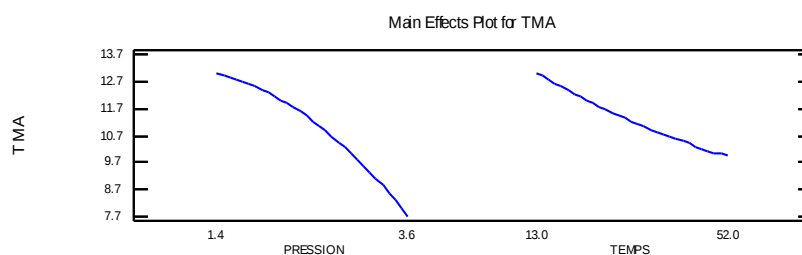


Figure III-83: Main effects plot for TMA

For better illustrating the variation of the TMA according to a couple of operational parameters, which are pressure and time of treatment, we use the response surface.

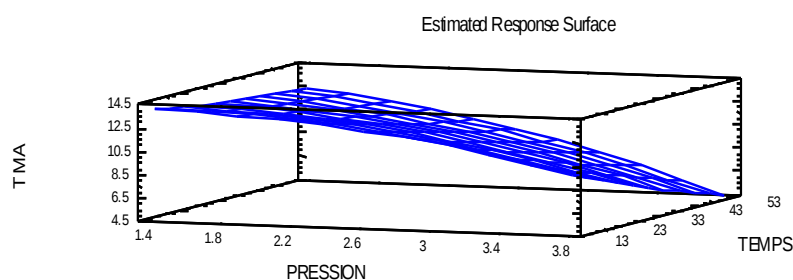


Figure III-84: Estimated response surface for TMA

III-6.6. CONCLUSION

In conclusion, the data obtained in the present work have demonstrated that the DIC used as a pretreatment in a solvent extraction process has a positive impact on the yield of extraction of anthocyanins from the dried calyces of Roselle. Between the different combinations of the parameters of DIC, the experiment 6 (P: 0.25 MPa; t: 5 s) have proved to be the best treatment giving an improvement of 145 % for TMA.

III-6.7. REFERENCES

- Allaf K., P. Vidal, Gradient Activity Report N° CR/89/103, University of Technology of Compiègne, June, 1989.
- Allaf K., N. Louka, J.M. Bouvier, F. Parent, J.M. Forget, French Patent n° 9309720, International Extension PCT FR 94/00975 of, 1994.
- Allaf K., Thermodynamique des transformations instantanées, Proceedings of "L'école d'été de l'Université Libanaise". July 2002
- Allaf K., N. Louka, Z. Maache-Rezzoug, S.-A. Rezzoug, E. Debs-Louka, A. Habba Et G. Abraham. Brevet français n° 98 11106 issu de la demande N° FR 98/11106 du 04/09/98 sous priorité de la demande française N° 98/02032 du, 19/02/98 publiée le 20 Août, 1999 sous le n° 2 774 911
- Joglekar, A. M. and A. T. May (1987). "Product excellence through design of experiments" *Cereal Foods World* **32**: 857–868.
- Louka, N. and K. Allaf (2004). "Expansion ratio and color improvement of dried vegetables textured by a new process "Controlled Sudden Decompression to the vacuum": Application to potatoes, carrots and onions." *Journal of Food Engineering* **65**(2): 233-243.
- Wang, C.-J., J.-M. Wang, et al. (2000). "Protective effect of *Hibiscus* anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats." *Food and Chemical Toxicology* **38**(5): 411-416.

PARTIE IV

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CHAPITRE IV-1. CONCLUSION

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons étudié l'effet de la modification de structure de la matière par un traitement thermo-mécanique de Détente Instantanée Contrôlée (DIC) sur l'opération d'extraction par solvant d'oligosaccharides à partir de graines de *Tephrosia purpurea* et d'anthocyanes à partir de la Roselle (*Hibiscus sabdariffa*).

La Détente Instantanée Contrôlée DIC a été étudiée, selon la méthodologie des plans d'expériences, appliquée aux différents produits cités plus haut. Les paramètres de la DIC qui ont été étudiés sont la pression de vapeur, le temps de traitement et la teneur initiale d'eau du produit. Concernant ce troisième paramètre, il n'a pas pu être étudié dans le cas de la Roselle pour des raisons techniques. Plusieurs paramètres de réponse ont été quantifiés et l'opération optimisée.

Ce prétraitement nous a permis une amélioration de l'opération en termes de cinétique et de rendement d'extraction. En effet, il a été démontré que l'extraction du cicéritol et du stachyose a été réalisée au bout d'une heure, au lieu de quatre heures classiquement. Pour l'extraction des anthocyanes l'opération a été effectuée en quatre minutes au lieu de dix minutes pour la matière non traitée par DIC. Dans le cas des deux produits étudiés, la pression de vapeur avait généralement un effet significatif et positif sur l'opération d'extraction des différentes molécules.

Concernant le rendement d'extraction, nous avons trouvé que le traitement par DIC donne systématiquement des quantités de soluté supérieures à ce qui a été obtenu sans prétraitement. Cette augmentation est variable avec les conditions de DIC. Ceci permettait de confirmer que la matière non traitée par DIC, qui était classiquement supposée lessivée au bout d'un temps d'extraction maximal, contenait bien une quantité résiduelle de soluté, qui était inaccessible auparavant, et que sa disponibilité a été augmentée par le traitement DIC. C'est ainsi qu'il a été conclu de l'effet mécanique de la détente par DIC, qui permettrait de casser certaines structures cellulaires de la matière et ainsi augmenter la quantité maximale extractible.

L'opération d'extraction de ces divers solutés a été étudiée selon une hypothèse de transfert par diffusion limitant.

Une analyse fondamentale visant la compréhension des processus élémentaires a permis de mieux modéliser les résultats expérimentaux. Une étude de la cinétique de l'opération a conduit à la détermination, pour chaque condition de traitement par DIC, de la diffusivité et s'en suivent des mesures de l'énergie d'activation équivalente pour certains points. La difficulté rencontrée lors de cette modélisation était due à la différence de la quantité maximale extraite, entre les différentes matières traitées par DIC entre elles et par rapport à la matière non traitée par DIC. La normalisation de la quantité extraite au cours du temps, par rapport à un maximum qui diffère d'un point à l'autre, ne permettait pas de mettre en évidence l'effet positif du traitement par DIC, qui était perceptible lors de la comparaison des rendements et des cinétiques avec la matière non traitée.

Une fois les paramètres opératoires de la DIC optimisés, nous avons essayé de modifier le protocole expérimental d'extraction, en jouant sur deux paramètres importants, le solvant et la température d'extraction. Concernant le solvant, comme sa diffusion a été

améliorée au moyen de l'expansion de la matrice solide, le choix a été basé principalement sur la capacité de celui ci à la mise en solution des molécules recherchées et nettement moins sur la base des propriétés de diffusion propres au liquide (viscosité...). On a fait varier pour cette raison la concentration en éthanol dans la composition du solvant d'extraction de 70% à 25%, et la température de 30 °C à 80 °C.

Pour chaque solvant, défini par sa concentration en éthanol, nous avons noté que globalement plus la température est élevée, plus le démarrage de l'extraction est rapide. On peut déceler une certaine amélioration de l'opération avec la température mais celle ci reste négligeable. Ceci nous amène donc à travailler à une température moyenne, à savoir 45 °C.

Cependant en termes de concentration en éthanol, peu d'effet a été accordé à la différence entre les solvants d'extraction, ce qui nous a amenés à privilégier la plus faible concentration en éthanol (25%).

Parallèlement, concernant les graines de *Tephrosia purpurea*, après avoir amélioré la quantité maximale extraite en cicéritol et stachyose, les deux marqueurs impliqués dans l'activité de l'extrait, nous avons décidé de comparer l'activité biologique de l'extrait de graines de *Tephrosia purpurea* non traitées par DIC, avec l'activité d'extraits à partir de graines différemment traitées par DIC.

Cette comparaison nous a permis d'avoir des résultats prometteur sur une augmentation de l'activité de l'extrait, cependant le fait d'atteindre un palier (phénomène de retro inhibition) : on a assez d'AMPc produit par la cellule, cette dernière n'a pas besoin d'en produire plus et donc elle arrête sa synthèse. A cause de ce phénomène, il nous a été impossible de voir les différences de stimulation entre les différents extraits. Il serait donc intéressant d'envisager de faire ces tests en partant de concentrations très faibles, par exemple la dose minimale qui permettrait de stimuler l'enzyme, et ainsi l'activité de stimulation des différents extraits serait plus perceptible.

CHAPITRE IV-2.

PERSPECTIVES

A la fin de cette étude, qui a pu apporter des réponses pertinentes et satisfaisantes aux divers contraintes et questions soulevées, des questions, autant sur le plan fondamental qu'appliqué, ont été générées et des perspectives peuvent être dégagées :

IV-2.1. SUR LA MATIERE PREMIERE :

Dans le présent travail, et dans le cas des graines de *Tephrosia purpurea* , on ne s'est intéressé qu'à la quantification de l'extraction des deux oligosaccharides : cicéritol et stachyose. Il serait intéressant de quantifier les autres sucres présents dans l'extrait, ainsi que d'autres molécules telles que les roténoïdes, molécules volatiles et toxiques, qui sont responsables de la toxicité de l'extrait.

Connaissant à travers des études précédentes, d'application de la DIC pour l'extraction des molécules volatiles (huiles essentielles, arômes...), on pourrait s'attendre, qu'avec la DIC on puisse éliminer une partie ou entièrement ces molécules et palier ainsi à la toxicité de l'extrait.

Il serait également intéressant d'étudier l'évolution de la composition chimique de ces graines avec les différentes conditions opératoires de traitement. La corrélation entre la composition, les conditions opératoires, et l'évolution sur le plan de la structure dégagerait une meilleure maîtrise de l'aptitude technologique de ces différents produits.

IV-2.2. SUR LE PLAN FONDAMENTAL

L'approche diffusionnelle que nous avons proposée nécessiterait une étude plus approfondie, afin de trouver un modèle faisant intervenir cette amélioration par DIC, et résoudre la problématique de l'utilisation de la normalisation par rapport à un maximum variable.

La différence de la structure à l'échelle microscopique doit jouer un rôle dans les phénomènes de diffusion et doivent expliquer les différences observées. Une étude plus fondamentale et plus approfondie, à l'échelle microstructurale, par analyse d'image couplée à la MEB, permettrait de mettre en évidence l'impact du traitement mécanique de la détente par DIC.

Dans tous les essais de traitement par DIC, nous nous sommes limités à l'étude de la détente réalisée à un niveau de vide constant (5×10^3 Pa) et une durée de détente maintenue constante (estimé à 10-1 s) ; des études précédentes avaient été réalisées concernant l'instantanéité de la détente et une détente à durée plus importante (2 à 3s) ; l'impact sur la structure était très important. Le développement de cet aspect sera particulièrement intéressant.

Un des paramètres opératoires, et qui est la teneur en eau initiale du produit, a pu être étudié dans le cas des graines de *Tephrosia purpurea* et non dans le cas de la Roselle. Et même dans le cas des graines de *Tephrosia*, l'effet ne peut pas être concluant vu la limitation de l'opération de réhumidification : en effet, la quantité d'eau additionnée pour réhumidifier le produit, est généralement faible, ne peut être répartie de façon homogène dans l'échantillon et même ne peut entrer à l'intérieur des cellules, ce qui expliquerait l'absence d'effet observé mais qui en réalité, un paramètre important à étudier.

Il serait intéressant d'étudier ce paramètre en partant de produits frais séchés à des teneurs d'eau déterminées, et non pas de faire l'opération dans le sens inverse, car on le

sait que l'opération de séchage provoque un phénomène de retrait qui empêcherait, même par trempage, quand cette opération est possible, de retrouver les conditions initiales de répartitions de l'eau dans les cellules.

IV-2.3. SUR LE PLAN DE L'ACTIVITE DE L'EXTRAIT

Les anthocynes sont les molécules responsables d'une activité antioxydante de l'extrait. Il serait alors intéressant d'étudier l'activité d'un tel extrait, surtout que celui obtenu à partir des calices de Roselle traités par DIC a montré, la présence d'une quantité plus importante d'anthocyanes, par rapport à l'extrait obtenu à partir de calices non traités par DIC.

Concernant l'extrait de *Tephrosia purpurea*, des essais d'activité à partir d'une concentration minimale seraient plus adéquats pour détecter les différences d'activité entre l'extrait obtenu à partir de graines traitées et non traitées par DIC.

IV-2.4. SUR LE PLAN ANALYTIQUE

Lors de cette étude, on a rencontré plusieurs difficultés dont principalement la complexité de quantification : en effet ce type d'étude comparative nécessite un nombre très important de points (cinétique, plan d'expériences, température), de plus la méthode de quantification dont on dispose (HPLC) est insuffisante pour ce type d'étude, c'est pour cette raison qu'il serait indispensable de penser à une autre méthode de quantification et de dosage qui soit la plus précise rapide et la plus fiable possible. Nous pensons par exemple à un système d'UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography), faisant appel aux mêmes principes que l'HPLC, mais qui apporte un progrès majeur dans trois domaines : résolution chromatographique, vitesse d'analyse et la sensibilité.

Dans cette optique, et pour confirmer les résultats annoncés dans ce travail, une analyse plus approfondie et plus détaillée serait parmi les perspectives qu'il faudrait envisager.

Lors de l'étude de l'optimisation du procédé d'extraction, on a essayé de modifier la composition du solvant en allant de 70% à 25% d'éthanol, il aurait été intéressant de tester de l'eau toute seule, comme solvant d'extraction, surtout que les sucres sont solubles dans ce solvant, on a essayé de réaliser ces essais mais pour des raisons analytiques on n'a pas réussi d'aller au bout de l'étude. Il serait très intéressant de continuer l'étude sur cet aspect.

IV-2.5. INDUSTRIALISATION DU PROCEDE

Il serait important d'exploiter les résultats obtenus à l'échelle laboratoire et pilote pour passer à l'échelle industrielle. Il faudrait compléter l'étude, par une étude économique du coût d'une telle opération et la rentabilité du procédé (consommation énergétique..).

PARTIE V

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aguilera, J. M. (2002). Structure and food engineering. Engineering and food for the 21st century. Boca Raton, FL: CRC Press: 495-511.

Aguilera, J. M. and D. W. Stanley (1999). Microstructural principles of food processing and engineering. Gaithersburg, Aspen Publishers.

Albu, S., E. Joyce, et al. (2004). "Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry." Ultrasonics Sonochemistry **11**: 261-265.

Allaf, K., N. Louka, et al. (1994). French Patent n° 9309720.

Allaf, K. and P. Vidal (1989). Gradient Activity Report N° CR/89/103, University of Technology of Compiègne.

Amiot-Carlin, M. J. (2004). Industrial extraction of bioactive substances from plants case of polyphenols. The SILAB's days.

André, P., S. Darnault, et al. (1995). Cosmetic or pharmaceutical and particularly dermatological composition containing an extract of *Tephrosia*, particularly *Tephrosia purpurea*. France. **WO 95/03780**: 20.

Anon, C. (1981). Prevention of discoloration of anthocyanins food coloring agents. Japanese Patent, Coca Cola.

Arentoft, A. M. and H. Soerensen (1992). Alpha galactosides and dietary fibres in relation to pea quality: Methods of oligosaccharide analyses. In: Proceedings of the 1st Conference on Grain Legumes. Anger: 457-458.

Bach Knudsen, K. E. and W. L. Betty (1991). "Determination of Oligosaccharides in Protein-Rich Feedstuffs by Gas-Liquid Chromatography and High-Performance Liquid Chromatography." J. Agric. Food chem. **39**: 689-694.

Bachmann, M., P. Matile, et al. (1994). "Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans* L. Cold acclimation, translocation and sink to source transition: discovery of chain elongation enzyme. ." Plant Physiol. **105**: 1335-1345.

Bachtez, M. (1948). "Mexican drugs, Plants and foods; IV hibiscic acid." Ciencia **9**: 121-123.

Basu, P. K. (1977). Indian Journal of Chemistry **15B**: 971.

Basu, P. K. (1977). Indian J. Chem. **15B**(10): 971.

Bazhal, I. G. and M. P. Kupshik (1983). "Sweetening off of sugar beet cossettes in an electric field." Sakharnaya Promyshlennost **3**(28-30).

Bernabé, M., R. Fenwick, et al. (1993). "Determination, by NMR spectroscopy, of the structure of ciceritol, a pseudotrisaccharide isolated from lentils." J. Agric. Food chem. **41**: 870-872.

Bernardo-Gil, M. G., J. Grenha, et al. (2002). "Supercritical fluid extraction and characterization of oil from hazelnut." European Journal of Lipid Science and Technology **104**: 402-409.

Bhatnagar, R. and R. C. Kapoor (2000). "Phytochemical investigation of *Tephrosia purpurea* seeds." Indian Journal of Chemistry **39B**: 879-882.

Bimbenet, J. J., A. Duquenoy, et al. (1993). Génie des procédés alimentaires des bases aux applications. Paris.

- Binbenet, J. J., A. Duquenoy, et al. (1993). Génie des procédés alimentaires des bases aux applications. Paris.
- Bird, R. B., W. E. Steward, et al. (1976). Diffusivity and the mechanisms of mass transport in Transport Phenomena. New York, John Wiley & Sons.
- Box, G. E. P., W. G. Hunter, et al. (1951). "On the experimental attainment of optimum conditions." Journal of the Royal Statistical society **13**(1): 1-45.
- Brachet, A., P. Christen, et al. (2002). "Focused microwave-assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves." Phytochemical Analysis **13**: 162-169.
- Brachet, A., S. Rudaz, et al. (2001). "Optimisation of accelerated solvent extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves." Journal of Separation Science **24**: 865-873.
- Brauns, F. E. (1952). The chemistry of lignin. New York, Academic press Inc.
- Bridle, P. and C. F. Timberlake (1997). "Anthocyanins as natural food colours--selected aspects." Food Chemistry **58**(1-2): 103-109.
- Brouillard, R. (1982). Chemical structure of anthocyanins. Anthocyanins as food colors. A. Press. New York: 1-38.
- Brouillard, R. (1993). The Flavonoids, Advances in research since 1986. C. a. Hall. London, éd. J. B. Harborne: 525-538.
- Brouillard, R. and B. Delaporte (1977). "Chemistry of anthocyanin pigments. II kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration and tautomeric reactions of malvidin-3-glucoside." J. Am. Chem.Soc. **99**: 8461-8468.
- Brouillard, R., G. Mazza, et al. (1989). "The copigmentation reaction of anthocyanins: a microprobe for the structural study of aqueous solutions." J. Am. Chem.Soc. **111**: 2604-2610.
- Bruni, R., A. Guerrini, et al. (2002). "Rapid techniques for the extraction of vitamin E isomers from *Amaranthus caudatus* seeds: Ultrasonic and supercritical fluid extraction." Phytochemical Analysis **13**: 257-261.
- Bunton, C. A., S. K. Huang, et al. (1975). "Conformation of the Tetrasaccharide Stachyose." Journal of the American Chemical Society **97**: 6264-6266.
- Cacace, J. E. and G. Mazza (2002). "Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water." J. Agric. Food chem. **50**: 5939-5946.
- Cacace, J. E. and G. Mazza (2003). "Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries." Journal of Food Engineering **59**(4): 379-389.
- Cacace, J. E. and G. Mazza (2003). "Optimisation of axtraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol." J. Food sci. **68**: 5939-5946.
- Chambers, C., K. Exaudi-Larsen, et al. (1996). "Aqueous extraction of solubles from oranges: a kinetic study." Food Chemistry **57**(4): 483-486.
- Chemat, S., A. Lagha, et al. (2004). "Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds." Flavour and Fragrance Journal **19**: 188-195.
- Clifford, M. N. (2000). "Anthocyanins-nature, occurence and dietary burden- a review." J. Sci. Food Agri. **80**: 1063-1072.

- Cooper, G. M. (1999). La cellule. Bruxelles, De Boeck Université.
- Cormier, F. (1997). Food colorants from plant cell cultures. Functionality of food phytochemistry. New York, Plenum press: 201-221.
- Crank, J. (1975). The mathematics of diffusion, Oxford University Press.
- Crittenden, R. G. and M. J. Playne (1996). "Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides." Trends in Food Science & Technology **7**: 353-361.
- Crossley, J. I. and J. M. Aguilera (2001). "Modeling the effect of microstructure on food extraction." Journal of Food Process Engineering **24**: 161-177.
- Csiktusnadi Kiss, G. A., E. F. Forgacs, et al. (2000). "Optimisation of the microwave-assisted extraction of pigments from paprika (*Capsicum annuum* L.) powders." Journal of Chromatography A **889**: 41-49.
- Cu, J. Q., F. Perineau, et al. (1989). "Comparison of the chemical composition of carrot seed essential oil extracted by different solvents." J. Flavour Fragra **4**(4): 225-231.
- Cusler, E. L. (1984). Diffusion: mass transfer in fluid systems. Cambridge, Cambridge University Press.
- Damre, A. S., A. B. Gokhale, et al. (2003). "Studies on the immunomodulatory activity of flavonoidal fraction of *Tephrosia purpurea*." Fitoterapia **74**(3): 257-261.
- Damre, S. A., A. B. Gokhale, et al. (2003). "Studies of the immunomodulatory activity of flavonoidal fraction of *Tephrosia purpurea*." Fitoterapia **74**(3): 257-261.
- Dibert, K. (1989). contribution à l'étude de l'extraction solide-liquide de l'huile et de l'acide chlorogénique du café vert. LYON, Claude Bernard LYON I.
- Dobrenz, A. K., S. E. Smith, et al. (1993). "Carbohydrates in Alfalfa seed developed for salt tolerance during germination." Agronomy Journal **85** (4): 834-836.
- Du, C. T. and F. J. Francis (1973). "Anthocyanins of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.)." J. Food.Sci. **38**: 810-812.
- El Afry, M. M. F., D. Prinz, et al. (1979). "Untersuchungen Zur Morphologie von Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*)." Der Tropienlandwirt **80**: 83-93.
- El belghiti, k. (2005). Amélioration de l'extraction aqueuse de solutés des produits végétaux par champ électrique pulsé. Génie des Procédés Industriels. Compiègne, Université de Technologie de Compiègne: 196.
- El Gengaihi, S. E. (1978). "The pigment of *Hibiscus sabdariffa* L." Acta Hortic. **73**: 115-119.
- Ericsson, M. and A. Colmsjo (2000). "Dynamic microwave-assisted extraction." Journal of Chromatography A **877**: 141-151.
- Escribano-Bailon, M. T., O. Dangles, et al. (1996). "Coupling reactions between flavylum ions and catechin." Phytochemistry **41**: 1583-1592.
- Espinoza-Pérez, J. D., A. Vargas, et al. (2007). "Mathematical modeling of caffeine kinetic during solid-liquid extraction of coffee beans." J Food Engineering **81**(72-78).
- Folkes, D. J. (1985). Gas-liquid chromatography. Analysis of Food Carbohydrate. London, Elsevier. **91**: 123.

- Frank, T., M. Janssen, et al. (2005). "Pharmacokinetics of Anthocyanidin-3-Glycosides Following Consumption of Hibiscus sabdariffa L. Extract." The Journal of Clinical Pharmacology **45**(2): 203-210.
- Franz, M. and G. Franz (1988). "*Hibiscus sabdariffa*-Hibiscusblüten." Z. Phytoter. **9**: 63-66.
- Frias, J., C. L. Hedley, et al. (1994). "Improved methods of oligosaccharides analysis for genetics studies of legume seeds." Journal of Liquid Chromatography **17**(11): 2469-2483.
- Fuleki, T. and F. J. Francis (1968). "Quantitative methods for anthocyanins. 1. extraction and determination of total anthocyanin in cranberries." J. Food sci. **33**(72-78).
- Gao, L. and G. Mazza (1996). "Extraction of anthocyanin pigments from purple sunflower hulls." J. Food sci. **61**: 600-603.
- Gekas, V. (1992). Characterisation and properties of foods. Transport phenomena of foods and biological materials. Florida, Boca Raton: CRC Press. **Chapter 2**: 70-1.
- Gekas, V., F. A. R. Oliveira, et al. (2002). Non-Fickian mass transfer in fruit tissue. Engineering and food for the 21st century. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Gerin, M. (2002). Solvants industriels : Santé, Sécurité, Substitution.. Paris, Ed. Masson.
- Giusti, M., L. E. Rodriguez-Saona, et al. (1999). "Spectral characteristics, molar absorptivity and color of pelargonidin derivatives." J. Agric. Food chem. **47**: 4631-4637.
- Giusti, M. and Wrolstad R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. NY, John Wiley & Sons.
- Giusti M. and Wrolstad R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. NY, John Wiley & Sons.
- Grisebach, H. (1982). Anthocyanins as Food Colors. é. P. Markakis. New York, academic press: 69-92.
- Groubert, A. (1984). techniques d'extraction végétale. Montpellier, pharmacie.
- Guignard, J.-L. (2000). Biochimie végétale, DUNOD.
- Gupta, R. K., M. Krishnamurti, et al. (1980). Phytochemistry **19**(6): 1264.
- Hamburger, M., D. Baumann, et al. (2004). "Supercritical carbon dioxide extraction of selected medicinal plants-Effects of high pressure and added ethanol on yield of extracted substances." Phytochemical Analysis **15**: 46-54.
- Hang, Y. (1988). "Recovery of food ingredients from grape pomace." Process Biochem.: 2-4.
- Harborne, J. B. (1967). Comparative Biochemistry of the Flavonoids. A. Press. New York: 1-30.
- Hong, V. and R. E. Wrolstad (1990). "Use of HPLC separation/photodiode array detection for characterization of anthocyanins." J. Agric. Food chem. **38**(3): 708-715.
- Hopkins, W. G. (2003). Physiologie végétale. Bruxelles, De boek&Larcier.
- Hulbert, G. J., R. N. Biswal, et al. (1998). "Solid/liquid extraction of caffeine from guarana with methyl chloride." Food Science and Technology International **4**: 53-58.

Hurren, D. (1999). "Supercritical fluid extraction with CO₂." Filtration and Separation **36**: 25-27.

Jackman, R. L. and J. L. Smith (1996). Anthocyanins and betalains. Natural food colorants, Blackie Academic and professional: 244-280.

Jaganyi, D. and S. Mdletshe (2000). "Kinetics of tea infusion. Part 2: the effect of tea-bag material on the rate and temperature dependence of caffeine extraction from black Assam tea." Food Chemistry **70**(2): 163-165.

Jaganyi, D. and R. D. Price (1999). "Kinetics of tea infusion: the effect of the manufacturing process on the rate of extraction of caffeine." Food Chemistry **64**(1): 27-31.

Jaganyi, D. and P. J. Wheeler (2003). "Rooibos tea: equilibrium and extraction kinetics of aspalathin." Food Chemistry **83**: 121-126.

Joglekar, A. M. and A. T. May (1987). "Product excellence through design of experiments." Cereal Foods World **32**: 857-868.

Johansen, H. N., V. Glitsso, et al. (1996). "Influence of extraction solvent and temperature on the quantitative determination of oligosaccharides from plant materials by high-performance liquid chromatography." Journal of Agricultural and Food Chemistry **44**: 1470-1474.

Joshi, S. S., R. K. Shrivastava, et al. (1979). "Chemical examination of *Tephrosia purpurea* seeds." J. Indian. Chem. Soc. **56**: 303-305.

Kahafaga, E. R. and H. Koch (1980). "Reifegrad und qualität von karkadeh (*Hibiscus sabdariffa* L. var *sabdariffa*)-I-organische säuren." Angew. Botanik. **54**(5,6): 287-293.

Karawya, M. S., M. G. Ghourab, et al. (1975). "Study of Anthocyanin Content karkadeh "*Hibiscus sabdariffa*"." Egypt.J.Pharm.Sci **16**(3): 345-349.

Katake, K. (1980). Stabilisation of anthocyanin food color with flavones and flavonols. Japanese Patent, Saucy Kagaky Kogyo.

Kaufmann, B. and P. Christen (2002). "Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction." Phytochemical Analysis **13**: 105-113.

Kaufmann, B., P. Christen, et al. (2001). "Parameters affecting microwave-assisted extraction of withanolides." Phytochemical Analysis **12**: 327-331.

Kennedy, I. R., O. D. Mwandemele, et al. (1985). "estimation of sucrose, raffinose and stachyose in soybean seeds." Food Chemistry **17**: 85-93.

Khafaga, E. R. and H. Koch (1980). "Reifegrad und qualität von karkadeh (*Hibiscus sabdariffa* L. var *sabdariffa*)-I-organische säuren." Angew. Botanik. **54**(5,6): 287-293.

Khanna, P., R. Kamal, et al. (1977). Sci. Cult. **43**(9): 396-398.

Knudsen, I. M. (1986). "High-performance liquid chromatographic determination of oligosaccharides in leguminous seeds." J.Sci. Food Agric. **37**: 560-566.

Krasuk, J. H., J. L. Lombardi, et al. (1967). I&EC Process Design & Develop. **6**(2): 56-59.

Kratchanova, M., E. Pavlova, et al. (2004). "The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin." Carbohydrate Polymers **56**: 181-186.

- krishna, S. and T. P. Ghosh (1938). Curr. Sci. **6**: 454.
- Kuo, T. M., J. F. VanMiddleworth, et al. (1988). "Content of oligosaccharides and sucrose in various plant seeds." J. Agric. Food Chemistry **36**: 32-36.
- Kwon, J. H., J. M. R. Belanger, et al. (2003). "Application of microwave-assisted process (MAP TM) to the fast extraction of Ginseng saponins." Food Research International **36**: 491-498.
- Landbo, A.-K. R. and A. B. S. Meyer (2001). Enzymatic enhancement and oxidant activities of anthocyanins and other phenolic compounds in black currant juice. Biologically-active phytochemicals in food. Cambridge UK, Royal Society of Chemistry: 354-356.
- Lang, Q. and C. M. Wai (2001). "Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies-A practical review." Talanta **53**: 771-782.
- Leybros, J. and P. Frémeaux (1990). "Extraction solide-liquide aspects théoriques." techniques de l'ingénieur, traité Génie des procédés J1 077 06.
- Li, H., L. Pordesimo, et al. (2004). "High intensity ultrasoundassisted extraction of oil from soybeans." Food Research International **37**: 731-738.
- Liley, P. E., R. C. Reide, et al. (1984). Physical and chemical data. Perry's Chemical Engineer's Handbook. New York, McGraw-Hill Book Co: 247-289.
- Lin, R. I. and B. W. Hilton (1980). "Purification of commercial grape pigments." J. Food sci. **45**: 297-309.
- Loncin, M. and R. L. Merson (1979). Food Engineering. Principles and Selected Applications., Edition Academic Press.
- Louka, N. and K. Allaf (2004). "Expansion ratio and color improvement of dried vegetables texturized by a new process "Controlled Sudden Decompression to the vacuum": Application to potatoes, carrots and onions." Journal of Food Engineering **65**(2): 233-243.
- Luque-Garcia, J. L. and M. D. Luque de Castro (2003). "Ultrasound: A powerful tool for leaching." Trends in Analytical Chemistry **22**: 41-47.
- Luque-Garcia, J. L. and M. D. Luque de Castro (2004). "Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: An expeditive approach for solid sample treatment-Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds." Journal of Chromatography A **1034**: 237-242.
- Luque de Castro, M. D. and L. E. Garcia-Ayuso (1998). "Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future." Analytica Chimica Acta **369**: 1-10.
- Macheix, J.-J., A. Fleuriet, et al. (1990). Fruit phenolics. Boca Raton.
- Macrae, R. and A. Zand-Moghaddam (1978). "The determination of the component oligosaccharides of lupinseeds by high pressure liquid chromatography." J. Sei. Food. Agric. **29**: 1083-1086.
- Mafart, P. and E. Béliard (1993). Génie Industriel Alimentaire techniques séparatives. Paris, Techniques et Documentation-Lavoisier.
- Markakis, P. (1982). Stability of anthocyanins in foods. Anthocyanins as food colors. A. Press. New york: 161-180.

- Mason, T. J., L. Paniwnyk, et al. (1996). "The uses of ultrasound in food technology." Ultrasonics Sonochemistry **3**: 253-260.
- Mazza, G. and E. Miniati (1993). Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains. Boca Raton, CRC Press.
- Melecchi, M. I. S., M. M. Martinez, et al. (2002). "Chemical composition of Hibiscus tiliaceus L. flowers: A study of extraction methods." Journal of Separation Science **25**: 86-90.
- Merken, H. M. and G. R. Beecher (2002). "Measurement of food flavonoids by High Performance Liquid Chromatography: A review." J. Agric. Food chem. **48**: 577-599.
- Merlin, J. C., A. Statoua, et al. (1985). "Investigation of the in vivo organization of anthocyanins using resonance raman microspectrometry." Phytochemistry, **24**: 1575-1581.
- Métivier, R., F. J. Francis, et al. (1980). "Solvents extraction of anthocyanins from wine pomace." J. Food Sci. **45**: 1099-1100.
- Mohammad Mounir, S. (2007). Département Génie des procédés Industriels. La Rochelle, Université de La Rochelle.
- Mok, C. and N. S. Hettiarachchy (1991). "Heat stability of sunflower-hull anthocyanin pigment." J. Food sci. **56**: 553-555.
- Molins, C., E. A. Hogendoorn, et al. (1997). "Microwave assisted solvent extraction (MASE) of organochlorine pesticides from soil samples." International Journal of Environmental Analytical Chemistry **68**: 155-169.
- Oku, K., I. Sawatani, et al. (1998). "Trehalose content in foods." Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology-Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi **45**(6): 381-384.
- Oliveira, F. and C. Silva (1992). "Freezing influences diffusion of reducing sugars in carrot cortex." J Food Sci **57**(4): 932-936.
- Ollier, C. (1991). l'extraction végétale en phytothérapie. faculté de pharmacie. Montpellier, Université de Montpellier I.
- Pan, X., G. Niu, et al. (2003). "Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves." Chemical Engineering and Processing **42**: 129-133.
- Paul, H. (1995). Hibiscus sabdariffa L. Département de Pharmacie. Paris, Université RENE DESCARTES PARIS V.
- Pelter, A., R. S. ward, et al. (1981). "J. Chem.Soc. Perkin Trans." **1**: 2491.
- Pifferi, P. G. and A. Vaccari (1983). "The anthocyanins of sunflower. II. A study of the extraction process." Journal of Food Technology **18**: 629-638.
- Poiana, M., V. Sicari, et al. (1998). "Supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) extraction of grape fruit flavedo." Flavour and Fragrance Journal **13**: 125-130.
- Price, W. E. and J. C. Spitzer (1994). "The kinetics of extraction of individual flavanols and caffeine from a Japanese green tea (Sen Cha Uji Tsuyu) as a function of temperature " Food Chemistry **50**(1): 19-23.
- Quemener, B. and J. M. Brillouet (1983). "Ciceritol, a pinitol digalactoside from seeds of chickpea, lentil and white lupin " Phytochemistry **22**(8): 1745-1751.

- Rahman, H., T. M. Kashfudduja, et al. (1985). "Hypoglycaemic activity of *Tephrosia purpurea* seeds." Indian. J. Med. Res. **81**: 418-421.
- Rangaswami, S. and K. H. Rao (1959). Proc. Indian Acad. Sci. **49A**: 241.
- Rao, E. V. and N. R. Raju (1979). Phytochemistry **18**(9): 1581-1582.
- Reaubourg, G. and R. H. Monceaux (1942). "Le Karkadé (*Hibiscus sabdariffa* L.), étude des caractères chimiques, botaniques et pharmacologiques." J. Pharm. Chim. **1**: 292-305.
- Romdhane, M. and C. Gourdon (2002). "Investigation in solid-liquid extraction: Influence of ultrasound." Chemical Engineering Journal **87**: 11-19.
- Romdhane, M., C. Gourdon, et al. (1995). "Local investigation of some ultrasonic devices by means of a thermal sensor." Ultrasonics **33**: 221-227.
- Roques, M. A. (1987). Diffusion in foods : the work of Cost 90bis subgroup. Physical properties of foods. London, Elsevier Applied Science: 13-26.
- Rosenthal, A., D. L. Pyle, et al. (2001). "Combined effect of operational variables and enzyme activity in aqueous enzymatic extraction of oil and protein from soybean." Enzyme Microb. Technol. **28**: 499-509.
- Saleem, M., S.-u. Ahmed, et al. (2001). "Tephrosia purpurea alleviates phorbol ester-induced tumor promotion response in murine skin." Pharmacological Research **43**(2): 135-144.
- Salisova, M., S. Toma, et al. (1997). "Comparison of conventional and ultrasonically assisted extractions of pharmaceutically active compounds from *Salvia officinalis*." Ultrasonics Sonochemistry **4**: 131-134.
- Sarni-Manchado, P. and V. Cheynier (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Londres-Paris-New york, Lavoisier.
- Schultz, H. and G. Ambroscheit (1989). "Characterization of oakmoss products used in perfumery by high-performance liquid chromatography." J. Chromatog A. **466**: 301-306.
- Schwartzberg, H. G. and R. Y. Chao (1982). "Solute diffusivities in leaching processes." Food Technology **36**(2): 73-86.
- Shah, S., A. Sharma, et al. (2005). "Extraction of oil from *Jatropha curcas* seed kernels by combination of ultrasonication and aqueous enzymatic oil extraction." Bioresource Technology **96**(1): 121-123.
- Sharma, A. and M. N. Gupta (2004). "Oil extraction from almond, apricot and rice bran by three-phase partitioning after ultrasonication." European Journal of Lipid Science and Technology **106**: 183-186.
- Sharma, A., S. K. Khare, et al. (2002). "Enzyme assisted aqueous extraction of peanut oil." J. Am. Oil. Chem. Soc. **79**: 215-218.
- Sharma, P., S. Rastogi, et al. (2003). "Antileishmanial action of *Tephrosia purpurea* Linn. extract and its fractions against experimental visceral leishmaniasis." Drug development Research **60**(4): 285-293.
- Sharma, R. and P. Khanna (1975). Indian J. Exp. Biol **13**(1): 84-85.
- Shukla, K. S. (1987). "Quantitative determination of oligosaccharides in defatted soybean products by high speed liquid chromatography." Fat Sci. Technol. **89**: 75-79.

Sihvonen, M., E. Jarvenpaa, et al. (1999). "Advances in supercritical carbon dioxide technologies

" Trends in Food Science and Technology **10**: 217-222.

Somers, T. C. and M. E. Evans (1974). "Wine quality: correlations with colour density and anthocyanin equilibria in a group of young red wines." J. Sci. Food Agri. **25**: 1369-1379.

Spar Eskilsson, S. and E. Bjorklund (2000). "Analytical-scale microwave-assisted extraction." Journal of Chromatography A **902**: 227-250.

Spiro, M., M. Kandiah, et al. (1990). J. Food Sci. Tech. **25**: 157-160.

Spiro, M. and P. L. Lam (1995). "Kinetics and equilibria of tea infusion part 12. equilibrium and kinetic study of mineral ion extraction from black Assam Bukial and green Chun Mee teas." Food Chemistry **54**: 393-396.

Spiro, M. and R. M. Selwood (1984). "The kinetic and mechanism of caffeine infusion from coffee: the effect of particle size." Journal of Food Science and Agricultural **35**: 915-924.

Swain, T. and W. E. Hillis (1959). "The phenolic constituents of prunus domestica. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. ." J. Sci. Food Agri. **10**: 63-68.

Timberlake, C. F. and P. Bridle (1979). "Interactions between anthocyanins, phenolic compounds and acetaldehyde and their significance in red wines." Am.J. Enol. Vitic **27**: 97-105.

Tolstikov, V. V. and O. Fiehn (2002). "Analysis of Highly Polar Compounds of Plant Origin: Combination of Hydrophilic Interaction Chromatography and Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry." Analytical Biochemistry **301**: 298-307.

Toury, J., R. Giogi, et al. (1967). "Aliments de l'ouest africain, Tables et composition." Ann. Nutri. Alim **21**(2): 73-127.

Turker, N. and F. Erdogan (2005). "Effects of pH and temperature of extraction medium on effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* var. L.)." Journal of Food Engineering In Press, Corrected Proof.

Udaya-Sankar, K., C. V. Raghavan, et al. (1983). "Studies on the extraction of caffeine from coffee beans." Journal of Food Science and Technology **20**: 64-67.

Varzakas, T. H., G. C. Leach, et al. (2005). "Theoretical and experimental approaches towards the determination of solute effective diffusivities in foods." Enzyme and Microbial Technology **37**(1): 29-41.

Vigneron, M. (1954). Fractionnements par solvants. Paris, VIGOT Frères.

Wang, C.-J., J.-M. Wang, et al. (2000). "Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats." Food and Chemical Toxicology **38**(5): 411-416.

Wang, L. and C. L. Weller (2006). "Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants." Trends in Food Science & Technology **17**(6): 300-312.

Welti-Chanes, J., F. Vergara-Balderas, et al. (2005). "Transport phenomena in food engineering: basic concepts and advances" J Food Engineering **67**: 113-128.

Wilska-Jeszka, J. (1991). "Anthocyanins as natural food colorants." IFI **3**: 10-15.

Wrolstad, R. E., J. D. Culberston, et al. (1982). "Detection of alduteration in Blackberry juice concentrates and wines." J. Assoc. Anal. Che. **65**: 1417-1423.

Wrolstad, R. E., R. W. Durst, et al. (2005). "Tracking color and pigment changes in anthocyanin products." Trends in Food Science & Technology **16**(9): 423-428.

Zafar, R. (1975). Curr. Sci. **44**: 311.

Zafar, R. and M. Mujeeb (2000). "Tephrosia purpurea (Linn.) pers: a review." Hamdard Medicus **43**(2): 61-71.

.

RESUME

Le présent travail de thèse porte sur l'étude de l'effet de la texturation par Détente Instantanée Contrôlée (DIC) sur l'opération d'extraction solide liquide d'oligosaccharides à partir des graines de *Tephrosia purpurea* et d'anthocyanes à partir de calices de Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) en vue d'améliorer la cinétique et le rendement d'extraction.

Une analyse fondamentale a prouvé l'importance de la diffusion du solvant dans la matrice solide et de l'extrait dans le solvant, en tant que principal processus limitant. L'expansion de la structure solide a donc été identifiée comme principale action devant mener à l'intensification de l'opération. L'effet des paramètres opératoires de la DIC (pression de vapeur et temps de traitement thermique) a été quantifié. L'étude a montré la capacité du traitement par DIC d'intensifier l'opération en termes de cinétique et de rendement d'extraction dans les deux cas du cicéritol et du stachyose à partir des graines de *Tephrosia purpurea* et d'anthocyanes à partir de calices de Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). Dans le cas des oligosaccharides, le temps d'extraction a été réduit à une heure au lieu de 4h. Le rendement a été amélioré d'un facteur de 150%. Concernant les anthocyanes, le temps d'extraction a été réduit à 3 minutes au lieu de 10 minutes et le rendement a été amélioré d'un facteur de 120%.

Une étude phénoménologique a permis de déterminer la valeur de la diffusivité d'extraction de ces différentes molécules dans la matière première et dans les matériaux différemment traités par DIC.

Les effets de la température d'extraction et du solvant ont également été étudiés dans le cas de l'extraction des oligosaccharides.

Mots clés : extraction, solvant, DIC, diffusivité, cicéritol, stachyose, anthocyanes.

ABSTRACT

The present work concerns the study of the impact of texturing by Instant Controlled Pressure-drop (DIC) on the operation of solid - liquid extraction in the cases of oligosaccharides from the *Tephrosia purpurea* seeds and of the anthocyanins from calyces of Roselle (*Hibiscus sabdariffa*); our objective has been to improve the extraction kinetics and yields.

A fundamental analysis has proved the importance of the diffusion of both solvent into the solid matrix and the extracted molecules in the solvent, and recognized it as the main limiting process. Thus, the expansion of the solid structure has been identified as the main action leading to improve the operation. The effect of the DIC operating parameters (steam pressure and heating treatment time) was quantified. The study showed the ability of DIC treatment for intensifying the operation in terms of extraction kinetics and yields in both cases of ciceritol and stachyose from the seeds of *Tephrosia purpurea* and anthocyanins from calyces of Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). In the case of oligosaccharides, the extraction time was reduced to one hour instead of 4hrs. The yield has been improved by 150%. Regarding anthocyanins, the extraction time was reduced to 3 minutes instead of 10 minutes and yields improved by a factor of 120%.

A phenomenological study allowed us to determine the value of the effective diffusivity in the raw material and in the materials differently treated by DIC. The effects of solvent temperature were studied in the case of oligosaccharide extraction.

Key words: extraction, solvent, DIC, diffusivity, ciceritol, stachyose, anthocyanins.