



HAL
open science

Valorisation des coproduits issus des industries d'agrumes : extraction des molécules bioactives par des technologies innovantes

Sally El Kantar

► **To cite this version:**

Sally El Kantar. Valorisation des coproduits issus des industries d'agrumes : extraction des molécules bioactives par des technologies innovantes. Génie des procédés. Université de Technologie de Compiègne; Université Saint-Joseph (Beyrouth). Faculté des Sciences, 2018. Français. NNT : 2018COMP2440 . tel-02139105

HAL Id: tel-02139105

<https://theses.hal.science/tel-02139105>

Submitted on 24 May 2019

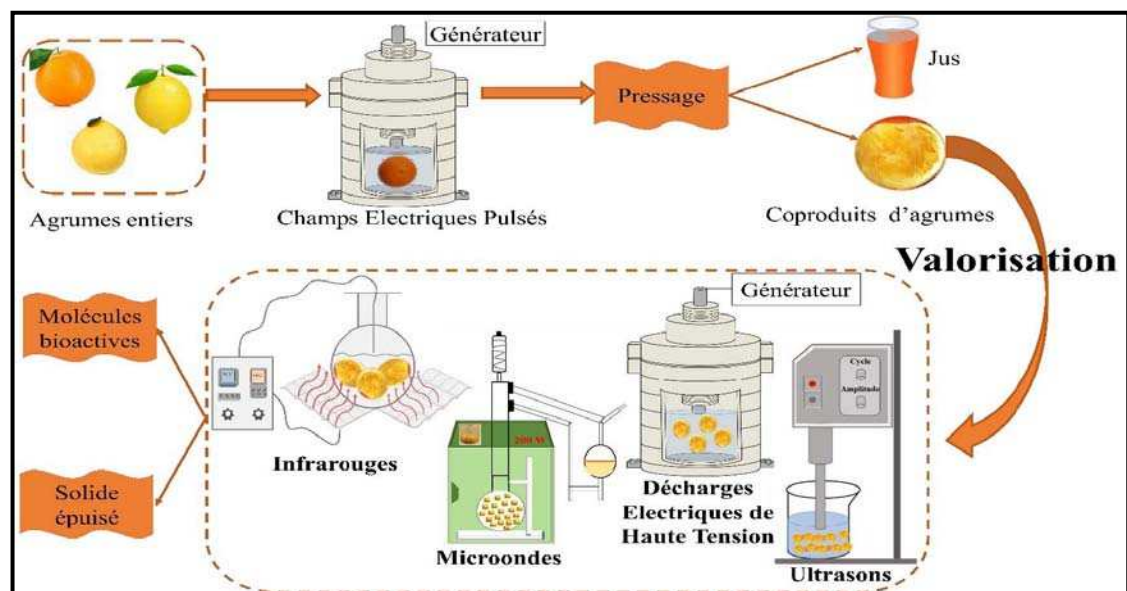
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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.

Par **Sally EL KANTAR**

Valorisation des coproduits issus des industries d'agrumes : extraction des molécules bioactives par des technologies innovantes

Thèse présentée en cotutelle
pour l'obtention du grade
de Docteur de l'UTC



Soutenue le 25 octobre 2018

Spécialité : Génie des Procédés Industriels et développement durable : Transformations intégrées de la matière renouvelable (EA-4297)

D2440

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée pour obtenir les titres de Docteur de :

**L'UNIVERSITÉ SAINT-JOSEPH DE BEYROUTH, FACULTÉ
DES SCIENCES
SPÉCIALITÉ : CHIMIE
ET**

**L'UNIVERSITÉ DE TECHNOLOGIE DE COMPIÈGNE
SPÉCIALITÉ : GÉNIE DES PROCÉDÉS INDUSTRIELS ET
DÉVELOPPEMENT DURABLE**

PAR SALLY EL KANTAR

Sujet de la thèse :

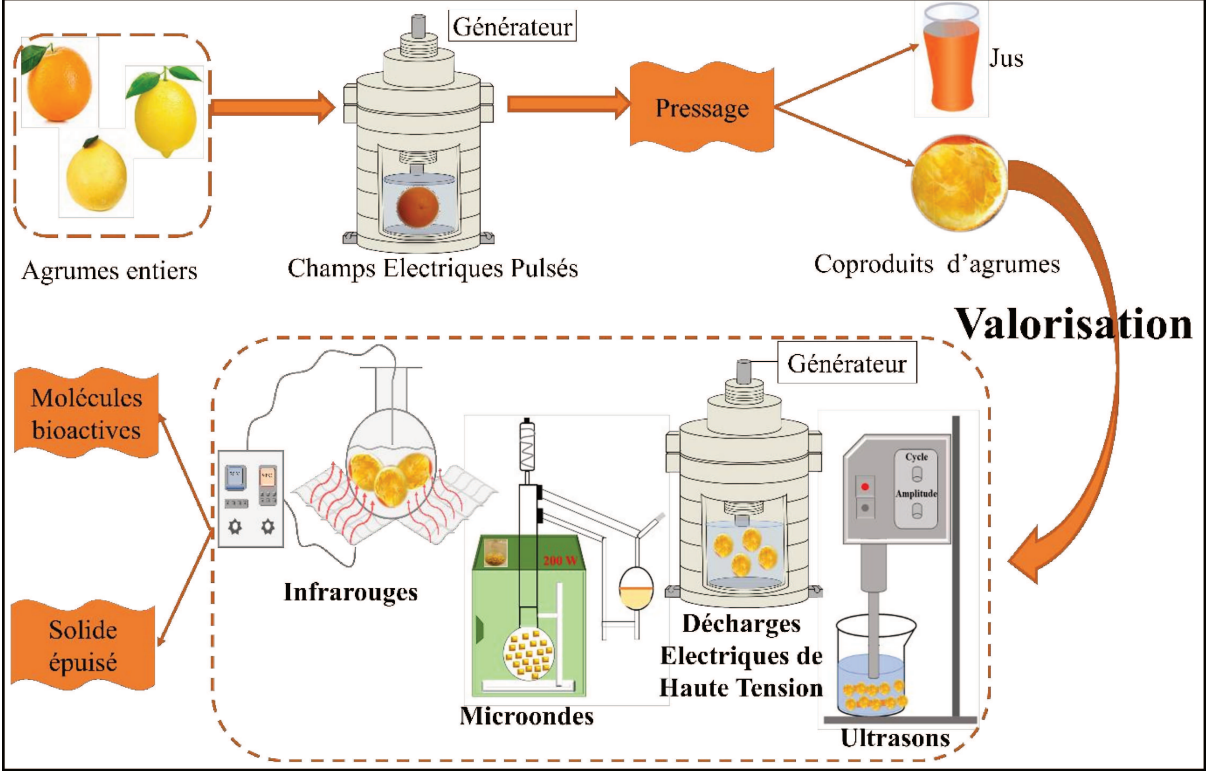
**Valorisation des coproduits issus des industries d'agrumes : extraction des
molécules bioactives par des technologies innovantes**

Soutenance le 25 octobre 2018

Devant le jury composé de :

Pr. Roger LTEIF	Examineur
Pr. Krasimir DIMITROV	Rapporteur
Pr. Hassan RAMMAL	Rapporteur
Dr. Nabil GRIMI	Examineur
Pr. Nicolas LOUKA	Directeur de thèse
Dr. Nadia BOUSSETTA	Directeur de thèse
Pr. Eugène VOROBIEV	Directeur de thèse
Pr. Richard G. MAROUN	Codirecteur de thèse

Valorisation des coproduits issus des industries d'agrumes : extraction des molécules bioactives par des technologies innovantes



Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé dans le laboratoire d'Intensification des Procédés Agro-Industriels (LIPAI), Unité de Recherche : Technologies et Valorisation Alimentaire (URTVA), Faculté des Sciences de l'Université Saint Joseph de Beyrouth (USJ) et le laboratoire de Transformations Intégrées de la Matière Renouvelable (TIMR), Centre de Recherches de Royallieu, Université de Technologie de Compiègne (UTC), France. Je remercie énormément toutes les personnes qui ont cru en moi et qui m'ont permis d'arriver au bout de cette thèse.

Je commence par remercier le CNRS-Libanais pour avoir financé ce projet de thèse. Je remercie également l'Université de Technologie de Compiègne et Campus France pour avoir contribué dans une partie du financement.

*Je tiens à exprimer mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci aux Professeurs **Krasimir DIMITROV** et **Hassan RAMMAL** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit et aux Professeur **Roger LTEIF** et Docteur **Nabil GRIMI** d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Je remercie énormément et j'exprime ma profonde gratitude au Professeur **Richard G. MAROUN** de m'avoir donnée l'occasion d'être membre dans son équipe et pour toutes les opportunités qu'il m'a offert. Je le remercie pour les échanges scientifiques que nous avons eu et ses précieux conseils tout au long de la thèse. J'ai toujours senti dans son regard un encouragement et une grande confiance.*

*J'adresse mes sincères et profonds remerciements à mes directeurs de thèse : Professeur **Nicolas LOUKA** qui est la première personne à avoir cru en moi et en mes capacités. Il m'a sélectionnée et donnée l'opportunité d'effectuer mon stage de master 2 à l'Université de Technologie de Compiègne. Merci pour m'avoir donnée l'occasion de continuer et de faire une thèse. Je le remercie aussi d'être toujours disponible pour répondre à toutes mes questions et toujours avec bonne humeur. Merci au Professeur **Eugène VOROBIEV** qui m'a accueillie au sein de son équipe et a gardé un œil bienveillant tout au long de la thèse. Je le remercie pour son intérêt et ses conseils qui ont été une source d'appui pour mener à bien ce travail. Merci à Docteur **Nadia BOUSSETTA** pour ses qualités scientifiques, professionnelles et humaines qu'elle m'a fait profiter. Je la*

remercie d'avoir supporté mes humeurs dépressives au cours des années de thèse et d'avoir toujours essayé de me soulager avec ses conseils et ses mails d'encouragement. Merci de m'avoir appris à être autonome et à prendre les initiatives.

Je remercie Docteur **Hiba N. RAJHA** qui *m'a accompagnée depuis mon master et m'a transférée* son savoir-faire et sa méthodologie de travail. *Merci pour m'avoir accueillie et aidée à surmonter les difficultés de la vie à Compiègne. Merci pour tous ses conseils et son encouragement et merci d'être toujours pour moi le bon exemple à suivre.*

Je remercie Docteur **Nabil GRIMI** pour sa bonne humeur, son sourire permanent et tous ses judicieux conseils scientifiques. Ma reconnaissance va également au Professeur Nicolai *LEBOVKA* avec qui j'ai eu l'opportunité de travailler à l'Université de Technologie de Compiègne.

*Une thèse c'est aussi un laboratoire où l'on passe de nombreuses heures et où il est important de se sentir bien. Alors un grand merci à tous les membres de l'équipe TAI : **Morad CHADNI, Mathieu HEBERT, Laurine BOGAERT, Jessica DÉ SABRES, Lucie DRÉVILLON, Pierre ADDA, Caiyun LIU, Rui ZHANG, Lu WANG, Sarra TADRENT, Marwa BRAHIM** pour l'ambiance scientifique et amicale qui règne au sein du laboratoire. Un grand merci aussi à tous mes collègues à la Faculté des Sciences de l'Université Saint-Joseph qui ont contribué au bon déroulement de ma thèse et à une bonne ambiance générale que ce soit par un échange instructif, un mot d'encouragement, un bon moment à la pause-café: **Ali DIA, Elie KHOURY, Nancy FAYAD, Hadi LOUTFI, Rim DBAISSY, Séréna DIB, Perla FARHAT, Hussein ZAYTOUN, Zaynoun ATTIEH, Rhéa KAHALE, Marina DACCACHE.***

Je remercie énormément **Halim TANNOUS**. Merci pour son soutien pendant mes périodes de doutes et pour ses multiples encouragements répétés. *Il a toujours su m'écouter et m'encourager. Merci de m'avoir supporté dans les moments les plus pénibles, et d'avoir rendu ma vie plus belle et moins difficile à Compiègne.*

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à ma famille, à mon père et ma mère. Leur confiance, leur tendresse, leur amour me portent et me guident tous les jours. Merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

A ma mère et à mon père, et à tous ceux que je ne nomme pas, mais qui se reconnaîtront.

Résumé

Ce travail de doctorat consiste à valoriser les coproduits issus des industries d'agrumes par des technologies innovantes. Le pressage des agrumes produit des millions de tonnes de déchets par an dans le monde. Ces déchets (peaux, pulpes et pépins) sont généralement dédiés à l'alimentation animale ou bien éliminés par compostage ou incinération. Cependant leur contenu en molécules bioactives conduit à plusieurs voies de valorisation. Vu que les peaux constituent à peu près la moitié de la masse des déchets d'agrumes, les études ont été faites sur la valorisation des peaux de différents types d'agrumes. Les méthodes conventionnelles généralement utilisées pour l'extraction des molécules d'intérêt (extraction solide-liquide, hydrodistillation) présentent plusieurs désavantages tels que l'utilisation des solvants coûteux et toxiques, les longues durées d'extraction et la consommation élevée en énergie. Pour cette raison plusieurs technologies innovantes non thermiques telles que les Champs Electriques Pulsés (CEP), les Décharges Electriques de Haute Tension (DEHT) et les ultrasons (US) et thermiques comme les microondes (MO) et les infrarouges (IR) ont été testées dans ce travail de thèse, pour la valorisation des coproduits d'agrumes. Les agrumes entiers (oranges, pomelos, citrons) sont traités par les CEP à une intensité de 3 kV/cm et l'extraction du jus d'agrumes et des polyphénols a été réalisée par pressage. L'étude de la perméabilisation cellulaire induite par les CEP a été réalisée par plusieurs méthodes et a montré que les degrés d'endommagement diffèrent selon le type d'agrumes traités. L'électroporation des cellules, induite par les CEP a permis d'augmenter les rendements en jus après pressage et d'améliorer le passage des polyphénols des peaux d'agrumes dans le jus. Ce qui explique la possibilité d'obtention d'un jus riche en polyphénols en traitant les agrumes par les CEP avant leur pressage. Parmi les solvants testés pour l'extraction des polyphénols à partir des peaux d'agrumes, l'eau est le moins efficace. L'ajout de 20% de glycérol dans l'eau a modifié la polarité du milieu et a amélioré l'extraction des polyphénols. L'utilisation d'un mélange enzymatique a favorisé la libération des polyphénols piégés dans les polysaccharides. Les solvants eutectiques profonds préparés, ont été aussi efficaces que les mélanges hydro éthanoliques. Pour améliorer d'avantages l'extraction dans les différents solvants verts ou dans le mélange enzymatique, les peaux d'agrumes ont été prétraitées par les DEHT dans l'eau. L'effet mécanique des DEHT, capable de fragmenter les peaux a permis d'améliorer l'extraction des polyphénols

dans les différents solvants. L'intensification de l'extraction des polyphénols a été aussi réalisée par les IR et les US. L'extraction des polyphénols par les IR a été optimisée en ayant recours à la méthodologie de surface de réponse. Le chauffage par les IR n'a pas altéré les polyphénols extraits qui ont gardé des activités antifongiques et anti-mycotoxinogènes importantes. Le prétraitement des peaux d'agrumes par les IR sans solvant a fragilisé les structures cellulaires, ce qui a permis d'augmenter la diffusion des polyphénols durant le traitement avec les US.

Mots clés: polyphénols, extraction, peaux d'agrumes, champs électriques pulsés, décharges électriques de haute tension, infrarouges, ultrasons, solvants verts.

Abstract

This work consists of the valorization of citrus by-products with innovative technologies. Citrus pressing produces millions of tons of waste per year worldwide. This waste (peels, pulps and seeds) is generally dedicated to animal feed or eliminated by composting or incineration. However its content in bioactive molecules leads to several ways of valorization. Since peels present about half of the citrus waste mass, studies have been focused on the valorization of citrus peels by the extraction of bioactive compounds. Conventional methods generally used for the extraction of bioactive compounds (solid-liquid extraction, hydrodistillation) have several disadvantages such as the use of expensive and toxic solvents, long extraction times and high energy consumption. For this reason, several innovative non-thermal technologies such as Pulsed Electric Fields (PEF), High Voltage Electrical Discharges (HVED) and Ultrasounds (US) and thermal treatments such as microwaves (MO) and infrared (IR) have been tested for the valorization of citrus by-products. Whole citrus fruits (oranges, pomelos, lemons) were PEF treated at an intensity of 3 kV/cm, then citrus juice and polyphenols were extracted by pressing. The study of the PEF-induced cell permeabilization was conducted by several methods and showed that the degree of damage varied according to the type of the treated fruit. The electroporation of the cells induced by the PEF, allowed an increase the juice yields after pressing and improved the liberation of the polyphenols from the citrus peels into the juice. This explains the possibility of obtaining a juice rich in polyphenols by treating the whole fruits with PEF before pressing. Among the solvents tested for the extraction of polyphenols from citrus peels, water is the least effective. The addition of 20% glycerol to water changed the polarity of the medium and improved the extraction of the polyphenols. The use of an enzyme mixture enhanced the release of the polyphenols related to the polysaccharides. Deep eutectic solvents have been as effective as hydroethanolic mixtures. To improve the yields and the kinetics of extractions in the different green solvents and in the enzyme mixture, citrus peels were pretreated with HVED in water. The mechanical effect of HVED, based on the fragmentation of the peels has improved the extraction of polyphenols in the various solvents. The intensification of polyphenols extraction was also conducted by IR and US. The extraction of polyphenols by IR was optimized using the surface response methodology. IR heating did not alter the extracted polyphenols which have significant antifungal and anti-mycotoxinogenic

activities. The pretreatment of citrus peels with IR weakened the cell structures, increasing thus the diffusion of polyphenols during US treatment.

Keywords: polyphenols, extraction, citrus peels, pulsed electric field, high voltage electrical discharges, infrareds, ultrasounds, green solvents.

Table des Matières

Nomenclature/Abréviations	12
Liste des Figures	15
Liste des Tableaux	18
Introduction Générale	19
Chapitre 1 : Etude Bibliographique	23
1.1. Les agrumes	23
1.1.1. Définition	23
1.1.2. Production d'agrumes dans le monde	24
1.1.3. Anatomie générale des agrumes	25
1.1.4. Transformation des agrumes	27
1.2. Les déchets résultant du pressage des agrumes	28
1.2.1. Les principales méthodes d'élimination des déchets	28
1.2.2. Notion de coproduits	29
1.3. La composition des coproduits d'agrumes	30
1.3.1. Les composés phénoliques	30
1.3.2. Les huiles essentielles	38
1.3.3. Les fibres alimentaires	41
1.3.4. Les pigments	44
1.4. Valorisation des coproduits d'agrumes : extraction des molécules bioactives	45
1.4.1. Extraction solide-liquide conventionnelle	45
1.4.2. Extraction solide-liquide dans les solvants verts	48
1.4.3. Extraction solide-liquide assistée par les enzymes	52
1.4.4. Technologies d'extraction innovantes	54

1.5. Conclusions et positionnement du sujet	81
Chapitre 2 : Matériels et Méthodes	84
2.1. Matières premières.....	84
2.1.1. Agrumes.....	84
2.1.2. Peaux d'agrumes.....	85
2.2. Les procédés d'intensification de l'extraction	86
2.2.1. Les microondes	86
2.2.2. Les champs électriques pulsés	87
2.2.3. Les décharges électriques de haute tension	88
2.2.4. Les ultrasons	89
2.2.5. Les infrarouges	90
2.3. Extraction par pressage	91
2.4. Extraction solide-liquide conventionnelle	92
2.4.1. Extraction solide-liquide dans les solvants verts.....	93
2.4.1.1. Extraction solide-liquide dans les solvants eutectiques profonds	93
2.4.1.2. Extraction solide-liquide dans le glycérol.....	94
2.4.2. Extraction solide-liquide assistée par les enzymes.....	95
2.5. Analyses physico-chimiques	95
2.5.1. Analyse des produits solides	95
2.5.2. Analyse des extraits liquides.....	98
2.6. Modélisation de la cinétique d'extraction suivant la loi de Fick	101
2.7. Les paramètres de solubilité de Hansen	102
2.7.1. Calcul des paramètres de solubilité de Hansen.....	102
2.7.2. La sphère de Hansen	104
2.8. Optimisation par la méthodologie de surface de réponse	105

2.8.1. Plan composite centré à 3 facteurs	105
Chapitre 3 : Résultats et Discussion.....	107
3.1. Augmentation des rendements en jus d'agrumes et extraction des molécules bioactives à partir des peaux d'agrumes par des technologies électriques	107
3.1.1. Traitement des agrumes entiers par les champs électriques pulsés : amélioration de l'extraction du jus et des polyphénols	108
3.1.2. Traitement des peaux d'agrumes avec les DEHT : intensification de l'extraction des polyphénols	119
3.2. Extraction des molécules bioactives à partir des peaux d'agrumes avec les infrarouges	158
3.2.1. Extraction des polyphénols à partir des peaux d'oranges avec les infrarouges : étude de leur effet antifongique.	158
3.2.2. Intensification de l'extraction des polyphénols à partir des peaux d'oranges avec les ultrasons : prétraitement des peaux avec les infrarouges	183
Conclusions et Perspectives	204
Références Bibliographiques	208

Nomenclature/Abréviations

Désignations latines :

a : rayon d'une cellule sphérique (cm)

C : capacité thermique spécifique (kJ/kg°C)

\bar{C} : concentration du soluté dans la matrice solide (g/L)

d : distance inter-électrodes (cm)

D : coefficient de diffusion moléculaire du soluté (m²/s)

D_p : profondeur de pénétration des ondes microondes (m)

E : intensité du champ électrique (V/cm)

E_{Hi} : liaisons par pont d'hydrogène présentes chaque groupe structural (J/mol)

f : fréquence (Hz)

f^c : force nécessaire pour couper le fruit traité par les CEP (N)

f_i^c : force nécessaire pour couper le fruit intact (N)

f_d^c : force nécessaire pour couper le fruit intact (N)

F : indice de fermeté du fruit traité par les CEP

F_i : indice de fermeté du fruit intact

F_d : indice de fermeté du fruit endommagé

F_{Di} : forces de dispersion présentes dans chaque groupe structural (J/cm³)^{1/2}/mol

F_{Pi} : forces entre les composants polaires présents dans chaque groupe structural (J/cm³)^{1/2}/mol

m : masse (kg)

M : masse du jus obtenu après pressage (kg)

M_i : masse initiale du fruit avant pressage (kg)

M_t : concentration du soluté dans l'extrait après un temps t (g GAE/100g MS)

M_∞ : concentration maximale du soluté après un temps infini (g GAE/100g MS)

MS : taux de matière sèche soluble (%)

Mt : millions de tonnes

n : nombre d'impulsions

P : puissance (W)

r : position du soluté à l'intérieur de la matrice solide (m)

t : temps (s)

t_i : durée d'une impulsion (s)

t_{CEP} : durée du traitement par les champs électriques pulsés (s)

T : température ($^{\circ}\text{C}$)

U : tension (V)

V : volume molaire (cm^3/mol)

V_m : potentiel transmembranaire (V)

W_i : énergie d'une impulsion (J)

W_{CEP} : énergie consommée par les champs électriques pulsés (kJ/kg)

W_{DEHT} : énergie consommée par les décharges électriques de haute tension (kJ/kg)

W_{IR} : énergie consommée par les infrarouges (kJ/kg)

W_{MO} : énergie consommée par les microondes (kJ/kg)

W_{US} : énergie consommée par les ultrasons (kJ/kg)

Y : rendement en jus (%)

Z_a : indice de désintégration acoustique

Z_f : indice de désintégration textural

Z_c : indice de désintégration de la conductivité électrique

Désignations grecques

α : ratio liquide-solide

δ : énergie totale de cohésion des substances ($\text{J}^{1/2}/\text{cm}^{3/2}$)

δ_D : forces de dispersion de London ($\text{J}^{1/2}/\text{cm}^{3/2}$)

δ_H : forces de liaison hydrogène ($\text{J}^{1/2}/\text{cm}^{3/2}$)

δ_P : forces de polarité de Keesom ($\text{J}^{1/2}/\text{cm}^{3/2}$)

ϵ' : constante diélectrique de la matière

ϵ'' : facteur de perte diélectrique

λ : longueur d'onde (nm)

ρ : masse volumique (g/cm^3)

σ : conductivité électrique (S/m)

σ_i : conductivité électrique à l'intérieur du fruit intact (S/m)

σ_d : conductivité électrique à l'intérieur du fruit endommagé (S/m)

θ : angle (rad)

Abréviations

ANOVA: Analysis of Variance

CEP : Champs Electrique Pulsés

CYA : Czapek Yeast Agar

DEHT : Décharges Electriques de Haute Tension

DNS : acide 3,5- dinitrosalicylique

DPPH : 2,2-diphényl-1- picrylhydrazyle

FBGU: Fungal Bêta-glucanase Units

GAE: gallic acid equivalent

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

LSD: Least Significance Difference

MO : Microondes

US : Ultrasons

Liste des Figures

Chapitre 1 : Etude Bibliographique

Figure 1-1. Classification des agrumes.	24
Figure 1-2. Les différentes productions fruitières mondiales.	25
Figure 1-3. Production mondiale d'agrumes en tonnes.	25
Figure 1-4. Coupe transversale schématique d'un agrume typique.	26
Figure 1-5. Schéma de l'extracteur FMC.	28
Figure 1-6. Les principales molécules bioactives présentes dans les agrumes après leur pressage.	30
Figure 1-7. Structure du noyau phénol	32
Figure 1-8. Structure générale des flavonoïdes.	32
Figure 1-9. Les principaux flavonoïdes présents dans les peaux d'agrumes.	36
Figure 1-10. Les glandes à huiles essentielles présentes dans le flavédo des agrumes, observées par microscopie.	39
Figure 1-11. Structure du limonène.	39
Figure 1-12. Unité de base de la cellulose : glucoses reliées par une liaison bêta -(1-4)-glycosidique.	42
Figure 1-13. Structure des monomères des hémicelluloses.	43
Figure 1-14. Les liaisons se formant entre deux composants d'un solvant eutectique profond . .	50
Figure 1-15. Profil des polyphénols a) dans le mélange glycérol-eau (9,3%) et b) dans le mélange éthanol-eau (60%).	51
Figure 1-16. Les molécules constituant la paroi cellulaire végétale.	52
Figure 1-17. L'effet des différentes enzymes sur l'extraction des polyphénols à partir des peaux d'agrumes.	53
Figure 1-18. Potentiel électrique V_m en un point m de la surface d'une cellule.	55
Figure 1-19. Schématisation de l'électroporation réversible et irréversible.	56
Figure 1-20. Schématisation des circuits électriques permettant la génération des impulsions électriques rectangulaires (a) et exponentielles (b).	57
Figure 1-21. L'indice de désintégration Z des cossettes de pommes en fonction de la durée du traitement par les CEP, pour différentes durées d'impulsions $t_i=10 \mu s$, $100 \mu s$ et $1000 \mu s$. τ représente le temps caractéristique d'endommagement cellulaire.	58
Figure 1-22. Le rendement en jus de pomme supplémentaire obtenu en fonction du temps de pressage (à 30 bars), sans CEP et après l'application des CEP à des nombres d'impulsions différents.	59
Figure 1-23. Le temps caractéristique pour l'endommagement cellulaire des pommes de terre en fonction de l'intensité des CEP à des températures différentes.	60
Figure 1-24. Schématisation des mécanismes d'action des décharges électriques de haute tension.	63

Figure 1-25. L'effet de l'énergie du traitement sur l'extraction des polyphénols à partir du marc de raisin.....	64
Figure 1-26. Effet de la distance entre les électrodes dans la chambre de traitement des DEHT sur les rendements et l'activité antioxydante des polyphénols extraits à partir du marc de raisin.	65
Figure 1-27. L'effet de la température sur l'extraction des solutés à partir du marc de raisin. Les lignes en pointillés suivies des lignes en gras correspondent aux traitements DEHT (distance entre les électrodes=5 mm ; U=40 kV ; n=80). Les lignes qui ne sont pas en gras correspondent aux témoins (sans DEHT).....	66
Figure 1-28. Schématisation de la croissance et de l'implosion d'une bulle de cavitation	67
Figure 1-29. Schématisation des mécanismes d'action des ultrasons.	68
Figure 1-30. L'effet de la puissance des US (a) et de la fréquence des US (b) sur l'extraction de la curcumine à partir de la plante Curcuma amada.....	70
Figure 1-31. L'effet du temps de prétraitement avec les ultrasons sur l'extraction des colorants à partir des fruits rouges.	71
Figure 1-32. Le spectre d'ondes électromagnétiques.	74
Figure 1-33. Le transfert de la chaleur durant un chauffage classique et durant le chauffage par les microondes.....	76
Figure 1-34. Représentation schématique du comportement de molécules possédant un dipôle en absence de champ électrique, sous l'effet d'un champ électrique continu et sous l'effet d'un champ électrique de haute fréquence.	77
Figure 1-35. Les concentration en polyphénols totaux et en flavonoïdes extraits à partir des peaux d'oranges en fonction de la puissance des MO.....	78
Figure 1-36. Schéma du réacteur dans l'extraction sans solvant assistée par les microondes.	80
Figure 1-37. Schéma du réacteur dans l'hydrodiffusion assistée par microondes et gravité.....	80

Chapitre 2: Matériels et Méthodes

Figure 2-1. Stratégie expérimentale globale.	84
Figure 2-2. Peaux d'agrumes de 1 cm ² de surface.	85
Figure 2-3. Extraction des huiles essentielles à partir des peaux d'oranges, avec les MO sans solvant.	86
Figure 2-4. Schéma de l'agrumes entier placé dans la chambre de traitement des CEP.	87
Figure 2-5. Schéma des peaux d'agrumes placées dans la chambre des CEP.	87
Figure 2-6. La chambre de traitement des CEP.	88
Figure 2-7. Le générateur des CEP.	88
Figure 2-8. Schéma des peaux d'agrumes placées dans la chambre des DEHT.	88
Figure 2-9. La chambre de traitement des DEHT.	89
Figure 2-10. Le générateur des DEHT.....	89
Figure 2-11. Schéma des ultrasons.	89
Figure 2-12. Le système de chauffage par les infrarouges.....	90
Figure 2-13. Fruit coupé avant le pressage.....	92

Figure 2-14. Chambre de pressage des agrumes.	92
Figure 2-15. Aspect du solvant eutectique profond obtenu, constitué d'acide lactique et de glucose avec comme proportion 5:1.	94
Figure 2-16. Système de mesures acoustiques.	96
Figure 2-17. Capteur de fermeté acoustique.	96
Figure 2-18. Texturomètre.	97
Figure 2-19. Les courbes de la force nécessaire pour couper le fruit intact, traité avec les CEP et complètement endommagé par congélation-décongélation, en fonction du temps.	97
Figure 2-20. Mesure de la conductivité électrique dans le fruit entier à l'aide d'un multimètre.	98
Figure 2-21. Les électrodes placées dans le fruit.	98
Figure 2-22. La structure du diacétone.	104
Figure 2-23. Les valeurs de F_{Di} , F_{Pi} et E_{Hi} pour les groupes structuraux du diacétone.	104
Figure 2-24. La sphère de Hansen. Le centre de la sphère correspond aux paramètres de solubilité du soluté d'intérêt. Les points bleus correspondent aux « bons » solvants et les carrés rouges sont les « mauvais » solvants.	104
Figure 2-25. Plan composite centré à 3 facteurs.	106

Liste des Tableaux

Chapitre 1 : Etude Bibliographique

Tableau 1-1. Les différentes classes de flavonoïdes.	32
Tableau 1-2. Les différentes classes des non flavonoïdes.	34
Tableau 1-3. Les concentrations en polyphénols obtenues à partir des peaux d'agrumes par différentes méthodes d'extraction.	37
Tableau 1-4. Les pourcentages en huiles essentielles obtenus à partir des peaux de différents agrumes par différentes méthodes d'extraction.	40
Tableau 1-5. La composition en fibres des coproduits d'agrumes (% Matière sèche).	44
Tableau 1-6. Structure des différents caroténoïdes.	44
Tableau 1-7. Les longueurs d'onde d'absorption (μm) de certains groupements chimiques dans le domaine des infrarouges.	74

Chapitre 2: Matériels et Méthodes

Tableau 2-1. Plan d'expérience pour l'extraction des composés phénoliques avec les infrarouges, en variant le temps, la température et le pourcentage éthanol-eau.	91
Tableau 2-2. Plan d'expérience pour l'extraction solide-liquide des composés phénoliques, en variant le temps, la température et le pourcentage éthanol-eau.	93
Tableau 2-3. Les solvants eutectiques profonds préparés.	94

Introduction Générale

Les agrumes appartiennent à la famille des Rutaceae et contiennent six genres inter-fertiles. Le genre **Citrus** est le plus connu, vu qu'il regroupe la majorité des fruits comestibles et commercialement importants (Groppo, Pirani, Salatino, Blanco, & Kallunki, 2008). Parmi les fruits de ce genre les plus cultivés dans le monde, on peut citer les oranges, les mandarines, les citrons et les pamplemousses. Tous ces fruits ont des morphologies différentes mais présentent la même structure anatomique. Cette structure correspond à une baie pluriloculaire composée de l'endocarpe et du péricarpe. L'endocarpe ou la pulpe est la partie comestible du fruit, contenant les sacs à jus et constituée de plusieurs segments, dont le nombre varie entre les espèces. Le péricarpe ou l'écorce est la partie non comestible du fruit constituée du flavédo (la couche externe colorée) et de l'albédo (la couche moyenne blanche) (Dugrand-Judek, 2015). La culture des agrumes est répandue partout dans le monde, dans plus de 140 pays, surtout dans les zones tropicales et subtropicales, de part et d'autre de l'équateur (de 40° nord à 40° sud) (Liu, Heying, & Tanumihardjo, 2012).

Les agrumes sont appréciés par les consommateurs grâce à leurs bienfaits pour la santé. Ils sont une source importante de fibres, de polyphénols, de vitamines et de minéraux. Les principaux flavonoïdes présents dans les agrumes sont l'hespéridine, la naringine, la narirutine et l'ériocitrine. Ils ont des propriétés thérapeutiques importantes et agissent comme des agents antioxydants, anticancéreux et anti-inflammatoires. Ils peuvent réduire les risques de nombreuses maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires (Ghasemi, Ghasemi, & Ebrahimzadeh, 2009). Les agrumes sont consommés sous forme fraîche ou sous forme de jus. Un tiers de la production des agrumes est traitée industriellement pour produire du jus, résultant en la formation de 15 millions de tonnes de déchets par an dans le monde (Putnik et al., 2017).

Les déchets générés après le pressage des agrumes (peaux, pulpes, pépins), représentent 50% à 60% de la masse des fruits pressés et les peaux constituent plus que la moitié (60% à 65%) de la masse de ces déchets (Negro, Ruggeri, Fino, & Tonini, 2017). Parmi les méthodes traditionnelles d'élimination des déchets, on peut citer la valorisation en alimentation animale, le compostage, l'incinération, la gazéification et l'épandage (Sharma, Mahato, Cho, & Lee, 2017). Cependant les déchets et principalement les peaux d'agrumes sont une source de molécules bioactives. Les

composants majeurs des peaux d'agrumes sèches sont la cellulose (entre 20% et 40%), les hémicelluloses (entre 8% et 11%), les pectines (entre 13% et 23%), les protéines (9%), la lignine (8%), les flavonoïdes (jusqu'à 4.5%) et les huiles essentielles (jusqu'à 4%) (Satari & Karimi, 2018). Les peaux peuvent donc trouver plusieurs voies de valorisation. Les études antérieures se sont axées sur leur utilisation pour la production de bioéthanol (Widmer, Zhou, & Grohmann, 2010) et l'extraction des composés bioactifs tels que les huiles essentielles (Aissou, Chematdjenni, & Chemat, 2017) et les pectines (Xu et al., 2014). L'extraction des polyphénols à partir des coproduits d'agrumes suscite un grand intérêt, grâce à la recherche d'antioxydants naturels ayant des propriétés antiradicalaires, antibactériennes et antifongiques, et sont utilisés pour la prévention contre de nombreuses maladies (Rafiq et al., 2016).

Cette thèse est effectuée en collaboration entre le laboratoire d'Intensification des Procédés Agro-Industriels (LIPAI), Unité de Recherche : Technologies et Valorisation Alimentaire (URTV), Faculté des Sciences de l'Université Saint Joseph de Beyrouth (USJ), Liban et le laboratoire de Technologies Agro-Industrielles (TAI), Unité de Recherche : Transformations Intégrées de la Matière Renouvelable (TIMR), Université de Technologie de Compiègne (UTC), France. Ce travail est soutenu par le Centre national de la recherche scientifique du Liban (CNRS), par l'Université de Technologie de Compiègne et par Campus France. Les matières premières sont fournies par la société BALKIS.

L'objectif de ce travail est la valorisation des peaux résultant de la transformation des agrumes, par l'extraction des molécules bioactives par des technologies innovantes, ainsi que l'amélioration des rendements en jus et de sa qualité nutritionnelle.

Plusieurs technologies innovantes telles que les champs électriques pulsés (CEP), les décharges électriques de haute tension (DEHT), les microondes (MO) et les ultrasons (US) ont été utilisées pour la valorisation des coproduits d'agrumes. De plus, une nouvelle méthode d'extraction avec les infrarouges (IR) a été mise au point et exploitée pour l'extraction des molécules d'intérêt. Nous avons aussi effectué l'extraction avec de nouveaux solvants verts qui pourront remplacer les solvants organiques généralement utilisés dans les procédés d'extraction.

Dans un premier temps, les CEP seront appliqués sur les agrumes entiers. L'objectif principal sera l'amélioration des rendements et de la qualité nutritionnelle des jus d'agrumes, avant de passer à la valorisation des peaux résultant du processus de pressage. Les endommagements induits par les

CEP seront caractérisés par des méthodes différentes, afin de mieux comprendre les effets des CEP.

Dans un second temps, les peaux d'agrumes résultant de leur pressage seront valorisées par des méthodes et des technologies différentes. Des solvants verts tels que les solvants eutectiques profonds et le glycérol seront proposés dans le but de remplacer les solvants organiques conventionnels, traditionnellement utilisés dans les procédés d'extraction. La diffusion solide-liquide sera améliorée en appliquant des prétraitements tels que les IR, les MO et les DEHT. Diverses technologies d'extraction telles que les IR, les US, les CEP et les DEHT seront employées et certains traitements seront combinés pour intensifier l'extraction des polyphénols. Certains procédés d'extraction seront optimisés par le moyen des plans d'expériences. La méthodologie de surface de réponse permettra une meilleure compréhension des effets des paramètres opératoires ainsi que les interactions entre les paramètres. La sélectivité d'extraction sera étudiée et les cinétiques d'extraction des biomolécules seront modélisées.

Ce travail sera divisé en 3 chapitres :

Le **chapitre 1** intitulé « étude bibliographique » présentera l'état de l'art sur les agrumes, leur origine, leur anatomie, leur production dans le monde et les principaux coproduits résultant de leur pressage. Une étude détaillée sur les principaux composés bioactifs présents dans les coproduits d'agrumes montrera l'importance de leur valorisation. L'analyse critique de la littérature permettra de relever les problématiques dues aux méthodologies d'extraction existantes, afin de trouver et de proposer des méthodes alternatives appropriées. Ce chapitre présentera aussi les méthodes d'extraction conventionnelles et les technologies innovantes pour l'extraction des composés bioactifs à partir des coproduits d'agrumes.

Le **chapitre 2** intitulé « matériels et méthodes » exposera la matière première, les dispositifs expérimentaux et les différentes analyses physico-chimiques utilisés dans le cadre de ce travail. Par ailleurs, une description détaillée de la méthodologie expérimentale adoptée sera effectuée.

Le **chapitre 3** intitulé « résultats et discussion » présentera les résultats obtenus quant à l'amélioration de l'extraction du jus après pressage des agrumes entiers et à la valorisation des peaux d'agrumes résultant du processus du pressage. La première partie de ce chapitre montrera l'efficacité du prétraitement des fruits entiers avec les CEP, d'une part sur l'amélioration des

rendements en jus obtenus et d'autre part sur le contenu du jus en polyphénols. La perméabilisation membranaire induite par les CEP sera caractérisée par le calcul des indices de désintégration acoustique, de texturométrie et de conductivité électrique. Les analyses de microscopie, et l'analyse du contenu phénolique des peaux (flavédo et albédo) des fruits traités avec les CEP, et des fruits intacts, permettra de connaître sur quelle partie du péricarpe agit les CEP.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, les peaux d'agrumes seront valorisées par des méthodes et des technologies différentes. Au fur et à mesure, une amélioration des conditions opératoires tels que les solvants utilisés et les méthodes de prétraitement, sera faite dans le but de proposer de nouvelles voies de valorisation efficaces. Tout d'abord les technologies électriques seront utilisées dans les procédés d'extraction. L'extraction verte des polyphénols aura lieu en utilisant de nouveaux solvants tels que les solvants eutectiques profonds. Les DEHT seront testés comme un moyen de prétraitement pour l'intensification de l'extraction solide-liquide dans les solvants verts. L'effet synergique qui existe entre le traitement électrique et la diffusion dans les solvants verts sera souligné par une modélisation des cinétiques d'extraction. Les DEHT seront aussi combinés avec l'hydrolyse enzymatique pour extraire les polyphénols et les sucres fermentescibles en bioéthanol. L'extraction avec les IR sera optimisée par la méthodologie de surface de réponse. L'utilisation de ce moyen de chauffage montrera la possibilité de réduire la consommation en solvant ainsi que la durée d'extraction. L'effet du prétraitement des IR et des US sur la quantité et la qualité des polyphénols extraits sera étudié. La sélection de la meilleure combinaison sera faite en fonction des rendements d'extraction et de la consommation en énergie.

En dernier lieu les **conclusions générales** rassembleront les principaux résultats obtenus et les **perspectives** proposeront de nouvelles pistes de recherche.

Chapitre 1 : Etude Bibliographique

1.1. Les agrumes

1.1.1. Définition

Les agrumes sont les fruits dérivant des plantes dicotylédones, appartenant à la famille des Rutaceae, sous-famille des Aurantioideae, tribu des Citreae et sous-tribu des Citrinae (Figure 1-1). Au sein de la tribu Citreae, les agrumes regroupent six genres inter-fertiles : **Citrus**, **Fortunella**, **Poncirus**, **Microcitrus**, **Eremocitrus** et **Clymenia** (Dugrand-Judek, 2015). Le genre **Citrus** regroupe un très grand nombre d'espèces d'une large diversité morphologique, résultant d'un long processus d'évolution et de possibilités de croisement entre les espèces. Il contient la majorité des espèces dont les fruits sont comestibles (les oranges, les mandarines, les citrons, les pomelos). Les agrumes appartenant à ce genre sont issus de 4 espèces de base : *Citrus medica* L. (cédratier), *Citrus reticulata* Blanco (mandarinier), *Citrus maxima* L. Osbeck (pamplemoussier) et *Citrus micrantha* (limettier). La combinaison entre ces 4 espèces de base est à l'origine de la diversité des agrumes. *Citrus aurantium* (bigaradier) est un hybride de première génération entre un pamplemoussier et un mandarinier alors que *Citrus sinensis* (oranger) provient de deux hybridations interspécifiques entre un pamplemoussier et un mandarinier. *Citrus paradisi* (pomelo) découle d'un croisement naturel entre un oranger et un pamplemoussier et *Citrus limon* (citronnier) résulte d'une combinaison entre un cédratier et un bigaradier (Khefifi, 2015). Les fruits du genre **Fortunella** sont connus sous le nom de kumquats. Ce genre contient deux à sept espèces. Le genre **Poncirus** ne contient qu'une seule espèce : *Poncirus Trifoliata*. Ses feuilles sont trifoliées et caduques et ses fruits ne sont pas comestibles. Le genre **Microcitrus** regroupe sept espèces. Les fruits de l'espèce *Microcitrus australasica*, connus sous le nom de « lime digitée d'Australie » sont récemment cultivés et commercialisés. Le genre **Clymenia** comporte seulement deux espèces. Il se distingue des autres agrumes par ses feuilles qui présentent un pétiole court et étroit (Antoine, 2014).

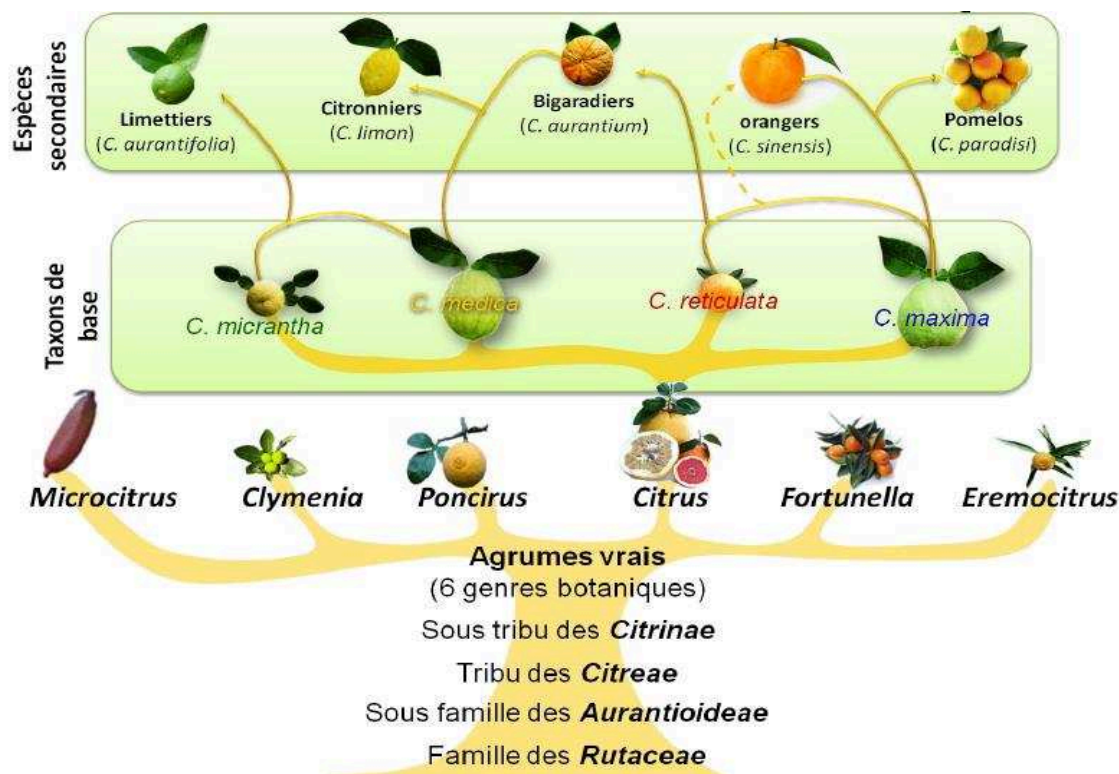


Figure 1-1. Classification des agrumes (Khefifi, 2015).

1.1.2. Production d'agrumes dans le monde

La production mondiale d'agrumes est la deuxième plus importante, estimée à 122,6 millions de tonnes (Mt) après la production de tomates (151,7 Mt) et devant la production de bananes (102 Mt), de pommes (69,5 Mt) et de raisins (67.1 Mt) (Figure 1-2) (Antoine, 2014; Zou et al., 2016). Les oranges sont parmi les agrumes les plus cultivés dans le monde (70,6 Mt), suivies des mandarines (25,5 Mt), des citrons (12,9 Mt) et des pamplemousses (6,4 Mt) (Putnik et al., 2017). La production d'agrumes est très répandue autour du globe (Figure1-3). Selon les données de la FAO (Food and Agriculture Organization), depuis l'année 1961, la Chine, le Brésil, les États-Unis, l'Inde, le Mexique et l'Espagne sont les principaux pays producteurs d'agrumes et représentant près des deux tiers de la production mondiale (Liu, Heying, & Tanumihardjo, 2012). En 2013, la production d'agrumes est estimée à 33104744 tonnes en Chine, 19734725 tonnes en Brésil, 10133246 tonnes aux Etats-Unis, 10090000 tonnes en Inde, 7613105 tonnes en Mexique et 6379100 en Espagne. Parmi 131 pays producteurs d'agrumes, le Liban est classé 45 avec 230497 tonnes et la France est classée 77 avec 43390 tonnes en 2013 (FAO, 2013).

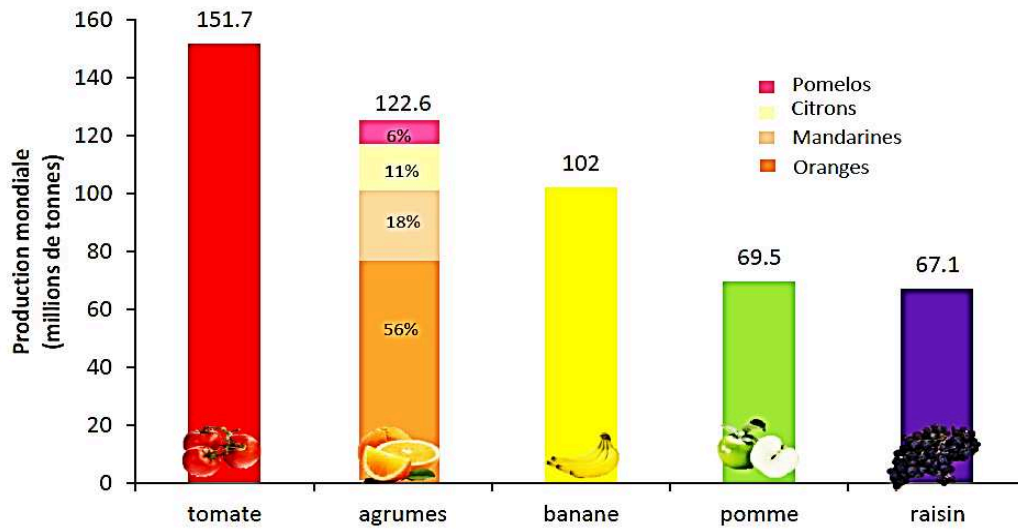


Figure 1-2. Les différentes productions fruitières mondiales (Antoine, 2014).

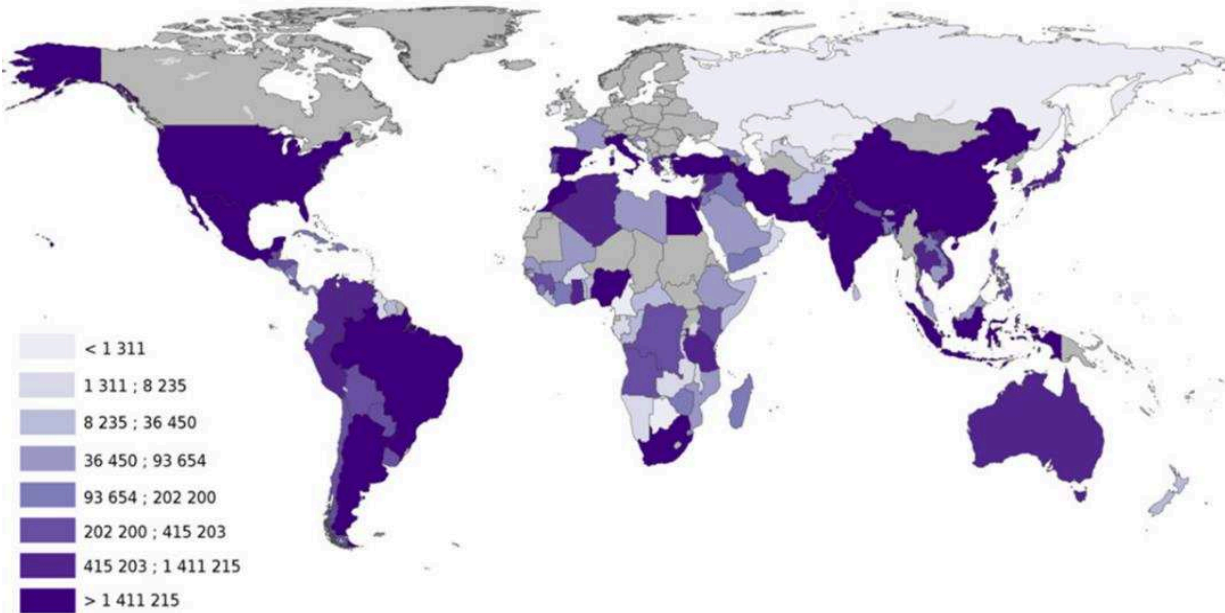


Figure 1-3. Production mondiale d'agrumes en tonnes (FAO, 2013).

1.1.3. Anatomie générale des agrumes

Les fruits d'agrumes se caractérisent par une diversité morphologique importante. Leur forme peut varier entre aplatie, ronde et oblongue et leur couleur du vert au rouge foncé. Le poids d'un fruit peut aller de quelques grammes (kumquat) à plusieurs kilogrammes (pamplemousse) et son

diamètre entre quelques centimètres et plusieurs dizaines de centimètres. Malgré cette diversité, les fruits d'agrumes présentent la même structure anatomique (Figure 1-4). Cette structure correspond à une baie pluriloculaire composée de deux parties distinctes : le péricarpe et l'endocarpe (Milind, 2008). L'écorce ou le péricarpe est la partie non comestible du fruit. Elle est composée de deux couches : le flavédo (épicarpe) et l'albédo (mésocarpe). Le flavédo est la couche externe, dont la couleur peut varier (jaune, verte, rouge ou orange) en fonction de sa composition en pigments. Le flavédo est riche en composés phénoliques. Ses glandes oléifères contiennent les huiles essentielles qui confèrent aux agrumes leurs odeurs caractéristiques. L'albédo est la couche moyenne, blanche et spongieuse. L'épaisseur de cette couche varie selon les espèces. Elle peut varier de quelques millimètres chez les mandarines ou les oranges jusqu'à plusieurs centimètres chez les cédrats ou les pamplemousses. L'albédo contient essentiellement les polysaccharides : pectine, cellulose et hémicellulose. La pulpe ou l'endocarpe est issue d'un seul ovaire constitué de plusieurs carpelles soudés. Le nombre de segments ou « quartiers » varie entre 5 et 18. Les quartiers sont entourés d'une membrane formée à partir de l'épiderme interne des carpelles. Les sacs à jus sont implantés autour d'un axe central et leurs vacuoles se remplissent de jus au cours du développement du fruit. La pulpe est riche en pigments, sucres et citrate (Dugrand-Judek, 2015).

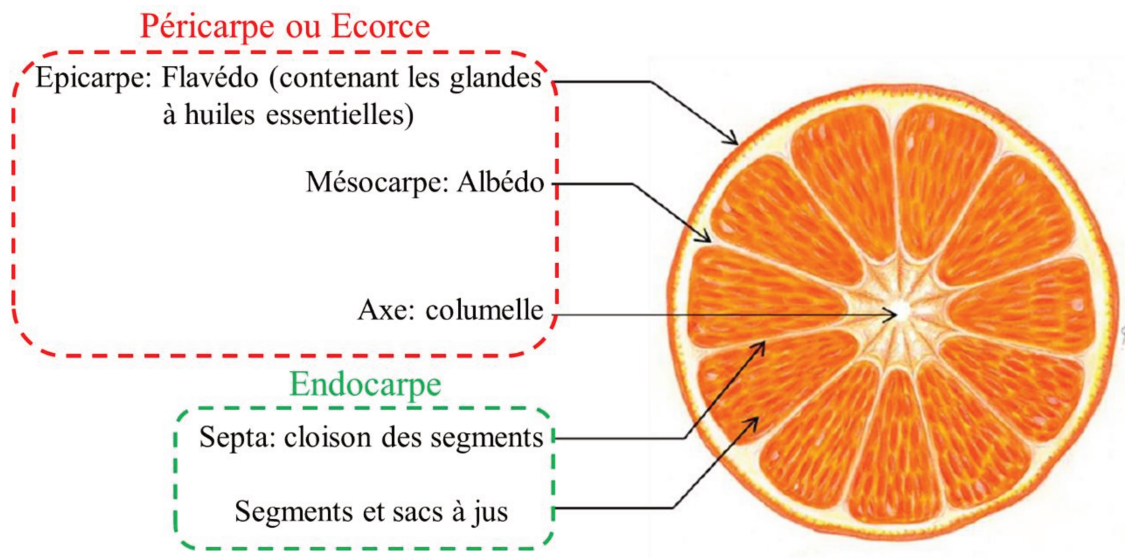


Figure 1-4. Coupe transversale schématique d'un agrume typique (Antoine, 2014).

1.1.4. Transformation des agrumes

La consommation des agrumes est appréciée grâce à leurs bienfaits sur la santé, attribués relativement à la présence des composés bioactifs. Parmi ces composés, on peut citer les composés phénoliques (spécifiquement les flavonoïdes) qui ont des effets anti-allergiques, anti carcinogènes et antiviraux, les vitamines (notamment les vitamines B et C) et les caroténoïdes. 33% de la production totale d'agrumes sont industriellement transformés en jus (Putnik et al., 2017).

Les principales étapes de production du jus sont les suivantes : après la récolte, les agrumes sont transportés en industrie. Après la sélection des agrumes et l'élimination des fruits abîmés, les agrumes sont automatiquement lavés à l'eau et calibrés de manière à correspondre à la taille des systèmes de pressage. Dans une troisième étape, le jus des fruits est extrait par pressage et centrifugation (Satari & Karimi, 2018). Le jus ou le concentré du jus obtenu est stérilisé ou quelques fois pasteurisé (cas du jus avec des durées de vie allant de quelques jours à un mois). Enfin, le jus pasteurisé ou stérilisé est transféré dans des emballages.

1.1.4.1. Le pressage des agrumes

Le pressage des agrumes consiste à extraire le jus contenu dans les vacuoles des cellules parenchymateuses situées dans le tissu comestible du fruit. Chaque cellule est entourée d'une paroi primaire constituée de pectines, de celluloses et d'hémicelluloses. Entre les parois primaires des cellules, se situe une lamelle moyenne composée principalement de pectines. L'extraction du jus nécessite la désorganisation de la structure du tissu comestible du fruit. Parmi les dispositifs utilisés pour le pressage industriel des fruits, on distingue les presses discontinues (presses à corbeille) et les presses continues (presses à bandes) (Cendres, 2010; Turk, 2010). Cependant, les presses utilisées pour le pressage des agrumes sont différentes de celles utilisées pour les autres fruits. Les extracteurs FMC (Food Machinery Corporation) sont utilisés dans l'élaboration de 55% à 60% de la production mondiale du jus d'orange (Figure 1-5). Le fruit entier est déposé entre deux coupelles supérieure et inférieure (1). La coupelle supérieure pousse le fruit sur le couteau circulaire inférieur (2). Le mouvement descendant du piston fait passer le contenu du fruit (jus, pulpe, pépins) dans le tube tamis (3). La coupelle supérieure obture le tube. Le piston remonte et presse la pulpe, permettant l'écoulement du jus à travers le tamis jusqu'au collecteur (4). Les grosses particules (pépins, fragments de mésocarpe) sont éliminés à travers le centre creux du piston (Cendres, 2010).

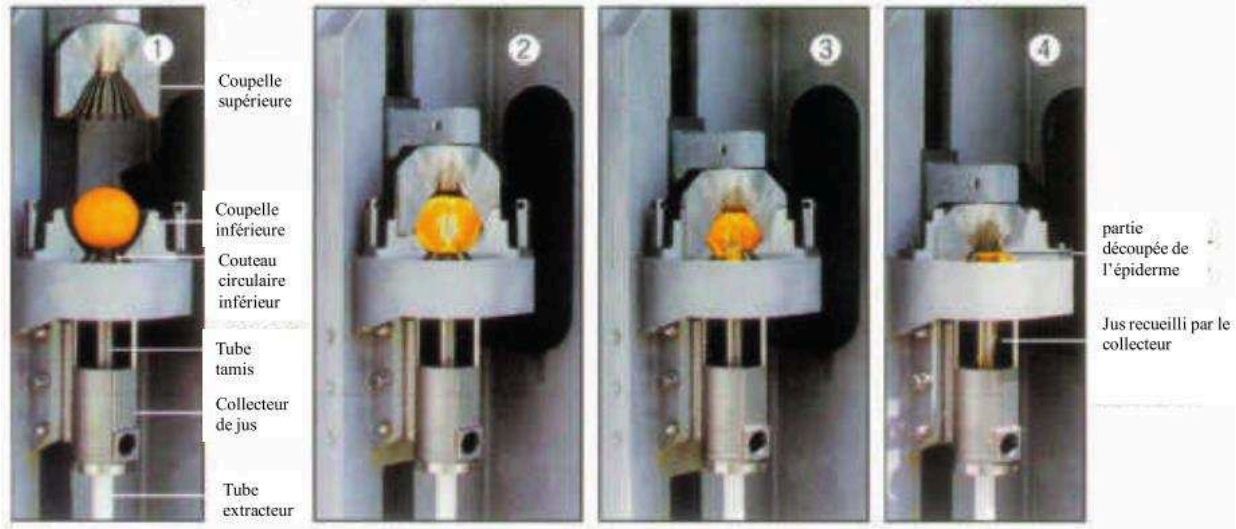


Figure 1-5. Schéma de l'extracteur FMC (Cendres, 2010).

1.2. Les déchets résultant du pressage des agrumes

Le pressage des agrumes résulte en la formation de 15 millions de tonnes de déchets industriels par an dans le monde. Les déchets d'agrumes contiennent principalement, les déchets générés après le pressage des agrumes et les fruits non pressés pour des raisons commerciales (fruits endommagés) ou des raisons de réglementation limitant la production. Les principaux déchets qui résultent de l'extraction du jus sont les peaux (flavédo et albédo), les pépins et la pulpe (Allaf, Tomao, Ruiz, & Chemat, 2013). Ils représentent 50% à 60% de la masse du fruit entier et les peaux constituent 60% à 65% de la masse de ces déchets. Ces déchets se caractérisent par un pH acide (3-4), une teneur élevée en eau (80%-90%) et une teneur élevée en matière organique (95% de la totalité du solide) (Negro, Ruggeri, Fino, & Tonini, 2017).

1.2.1. Les principales méthodes d'élimination des déchets

Les tonnes de déchets résultant de la transformation des agrumes causent des problèmes économiques et environnementaux importants tels que les coûts de transport élevés, le manque des sites de décharges et l'accumulation de la matière organique (Wikandari, Nguyen, Millati, Niklasson, & Taherzadeh, 2015). Les principales méthodes de gestion des déchets utilisées par les industriels sont les suivantes :

- La valorisation des déchets en alimentation animale grâce à leur valeur nutritive: c'est la méthode la plus traditionnelle.

- Le compostage : en conditions aérobies, la matière organique se décompose en matériaux avec des chaînes moléculaires plus petites et relativement stables. Cependant, le pH acide des déchets d'agrumes et leur contenu en huiles essentielles peuvent inhiber le processus de compostage et causer des problèmes de biodégradation.
- Les méthodes de traitement thermique : incinération, gazéification ou pyrolyse. Ces méthodes sont techniquement réalisables mais ne sont pas efficaces d'un point de vue énergétique ou économique. En raison des teneurs élevées en eau présentes dans les déchets d'agrumes, une étape préalable de déshydratation est nécessaire.
- L'épandage : les déchets des fruits contenant une teneur élevée en minéraux, peuvent être utilisés comme fertilisants.
- L'obtention des biocarburants : les déchets contiennent une grande quantité de composants organiques qui peuvent être transformés en énergie.

1.2.2. Notion de coproduits

Les déchets résultant de la transformation des agrumes contiennent des molécules à haute valeur ajoutée telles que les flavonoïdes, les pigments, les huiles essentielles et les sucres (Figure 1-6). Ils sont donc des substrats intéressants pour l'extraction et la récupération des composés bioactifs. Pour cette raison, le terme coproduit peut être utilisé pour caractériser ces déchets. Les coproduits sont définis comme étant les produits secondaires issus du processus de transformation de la matière végétale ou animale. Il s'agit de la partie inutilisable de la matière première (peaux, pépins). Ils se caractérisent par une grande hétérogénéité et contiennent des quantités élevées de molécules bioactives (Pradal, 2016). Ainsi la valorisation des coproduits par l'extraction des molécules bioactives, est un moyen important pour la réduction des déchets issus de la transformation des agrumes.

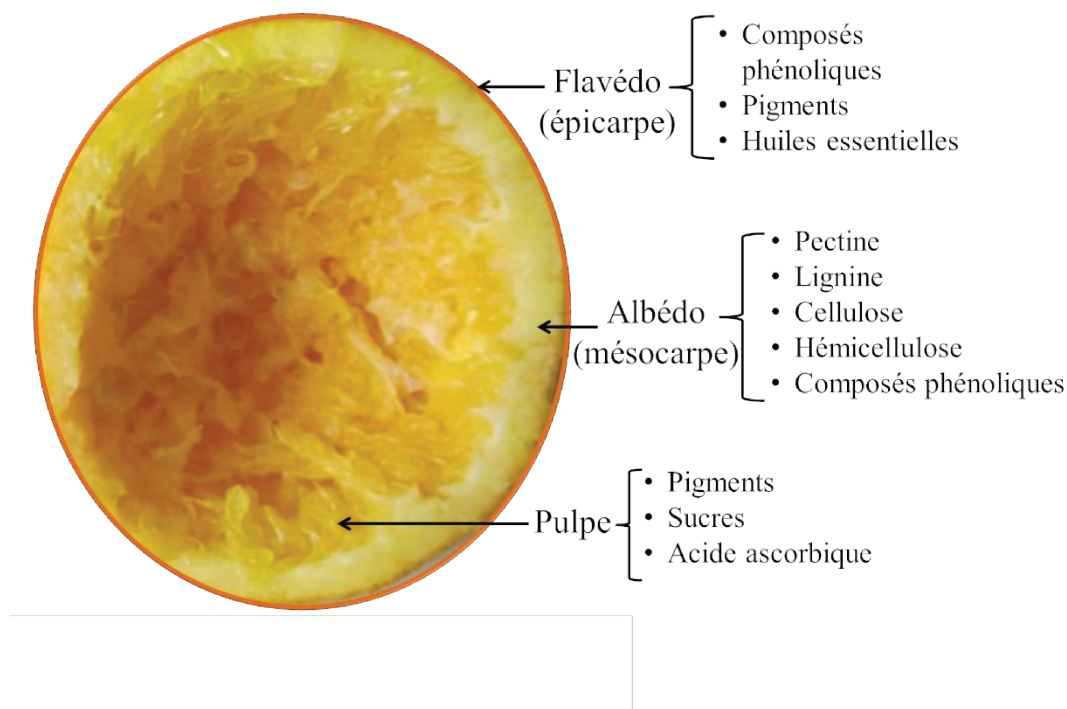


Figure 1-6. Les principales molécules bioactives présentes dans les agrumes après leur pressage.

1.3. La composition des coproduits d'agrumes

1.3.1. Les composés phénoliques

1.3.1.1. Définition

Les composés phénoliques sont des molécules bioactives issues du métabolisme secondaire des plantes. Ils interviennent dans différents aspects physiologiques de la plante telles que la régulation de la croissance, la lignification et les interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites. Les composés phénoliques confèrent aux fruits leurs couleurs et d'autres caractéristiques spécifiques (amertume, astringence). Ils jouent un rôle dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, résistance aux UV) (Balasundram, Sundram, & Samman, 2006).

Les composés phénoliques sont des molécules organiques caractérisées par la présence d'au moins un noyau phénolique à 6 carbones, auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle (OH) libre (Figure 1-7) ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside. Leur structure peut varier de celle d'une molécule phénolique simple à celle d'un polymère complexe de masse moléculaire élevée. La désignation générale «composés phénoliques» concerne à la fois

les mono, les di et les polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques (Muanda, 2010).

1.3.1.2. Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont divisés en deux classes majeures : les flavonoïdes et les non flavonoïdes.

A. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont caractérisés par la présence du squelette flavone. Le squelette flavone est constitué de deux noyaux aromatiques C₆ (A et B) reliés par un pont C₃ (C) contenant 3 atomes de carbone et un atome d'oxygène (Figure 1-8). Les flavonoïdes sont divisés en six classes : flavones, flavanones, flavanols, flavonols, isoflavones et anthocyanidines (Tableau 1-1) (Ignat, Volf, & Popa, 2011).

- **Les flavones**

Ce sont les flavonoïdes les moins fréquents dans les végétaux. Ils se trouvent surtout dans le persil et le céleri. Des flavones polyméthoxylés ont été retrouvés dans les peaux de citron.

- **Les flavanones**

Les flavanones sont généralement glycosylés par un disaccharide. Ils sont présents en concentrations élevées dans les agrumes. La naringénine est principalement retrouvée dans les pamplemousses, l'héspéritine dans les oranges et l'ériodictyol dans les citrons. Une très forte teneur en flavanones est présente dans l'albédo (la partie blanche spongieuse) des peaux d'agrumes.

- **Les flavanols**

Les flavanols peuvent aller des simples monomères, (+)-catéchine et son isomère (-)-épicatéchine, jusqu'aux oligomères et polymères, les proanthocyanidines. Ils peuvent être estérifiés par l'acide gallique ou hydroxylés pour former les gallocatéchines. La catéchine est majoritaire dans le chocolat, le thé et les fruits comme les abricots.

- **Les flavonols**

Les flavonols se caractérisent par la présence d'un groupement OH en position C₃. Ils peuvent exister soit sous forme d'aglycones, soit sous forme d'hétérosides. Leurs principaux représentants sont la quercétine, le kaempférol et la rutine. Les principales sources de flavonols sont les oignons, les choux et les poireaux.

• **Les anthocyanidines**

Ce sont des pigments, principalement sous forme de glycosides stables et hydrosolubles, responsables de la couleur rouge, bleue et violette des tissus végétaux. Ils sont principalement présents dans le raisin (vin rouge), les fruits rouges et certains légumes (choux, oignons, haricots, radis) (Achat, 2014; Pradal, 2016).

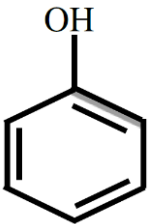
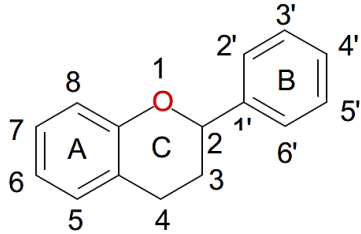
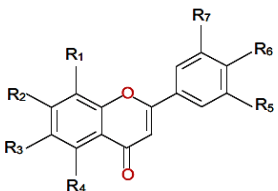
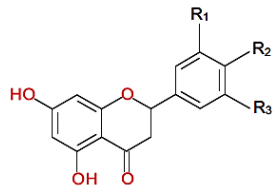
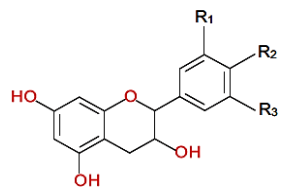
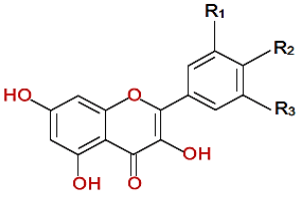
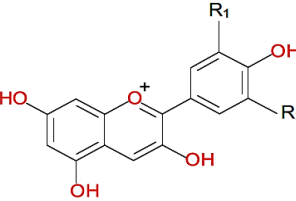
	
<p>Figure 1-7. Structure du noyau phénol (Achat, 2014).</p>	<p>Figure 1-8. Structure générale des flavonoïdes (Wang, Yang, Li, & Bi, 2017).</p>

Tableau 1-1. Les différentes classes de flavonoïdes (Grigoras, 2012).

Classe	Structure chimique	Exemples
Flavones		<p>R1 = R2 = R3 = R4 = R6 = OCH3 ; R5 = R7 = H : Tangéretine</p> <p>R1 = R7 = H ; R2 = R3 = R4 = R5 = R6 = OCH3 : Sinensétine</p> <p>R1 = H ; R2 = OH : Apigénine</p> <p>R1 = R2 = OH : Lutéoline</p>
Flavanones		<p>R1 = H ; R2 = OH : Naringénine</p> <p>R1 = OH ; R2 = OCH3 : Hespérétine</p>
Flavanols		<p>R1 = R2 = OH ; R3 = H : Catéchine</p> <p>R1 = H ; R2 = R3 = OH : Epicatéchine</p>

Flavonols		<p>R1 = R3 = H ; R2 = OH : Kaempférol R1 = R2 = OH ; R3 = H : Quercétine</p>
Anthocyanidines		<p>R1 = OH ; R2 = H : Cyanidine R1 = R2 = H : Pélargonidine R1 = OCH3 ; R2 = H : Péonidine R1 = R2 = OH : Delphinidine R1 = OCH3 ; R2 = OH : Pétunidine R1 = R2 = OCH3 : Malvidine</p>

B. Les non flavonoïdes

Parmi les non flavonoïdes, on distingue les acides phénoliques, les tannins, les stilbènes et les lignanes (Tableau 1-2).

• Les acides phénoliques

Les acides phénoliques contiennent les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (C₆-C₁) et les dérivés de l'acide hydroxycinnamique (C₆-C₃). Les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque existent sous forme libre ou sous forme combinée à l'état d'esters ou de glucosides. Ils peuvent avoir une structure simple comme l'acide gallique et l'acide protocatéchique ou des structures plus complexes. Les dérivés de l'acide hydroxycinnamique sont rarement libres. Ils sont souvent estérifiés et peuvent également être amidifiés ou combinés avec des sucres (O-acylglucosides, O-arylglucosides) ou des polyols. L'acide caféique est le principal représentant de cette catégorie. Il représente 75% à 100% de la teneur totale en acides hydroxycinnamiques de la majorité des fruits.

• Tannins

Les tannins sont divisés en tannins hydrolysables et tannins condensés. Les tannins hydrolysables sont des esters du D-glucose et d'acides phénoliques (en particulier acide gallique ou ellagique). Les tannins condensés ou les proanthocyanidines sont des polymères constitués d'unités flavanes reliées par des liaisons entre les carbones C₄ et C₈ ou C₄ et C₆.

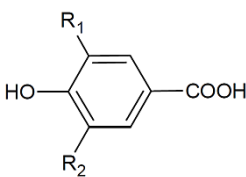
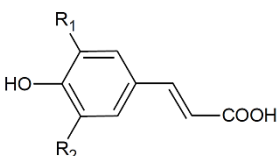
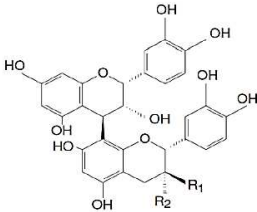
- **Stilbènes**

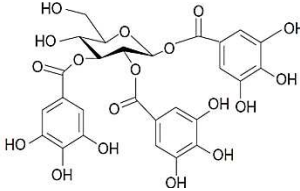
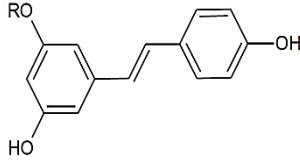
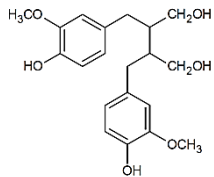
Les stilbènes ne sont pas très présents dans l'alimentation humaine. Le principal représentant des stilbènes est le resvératrol. Il existe sous forme isométrique cis et trans et sous forme glycosylée. La peau des raisins rouges est très riche en resvératrol. Il est donc présent en très grandes quantités dans le vin rouge et dans le jus de raisins.

- **Lignanes**

Les lignanes sont composées de deux unités de phénylpropane. Elles sont présentes dans la nature à l'état libre, tandis que leurs dérivés glycosidiques sont peu répandus. Les lignanes sont surtout présentes dans le lin sous forme de sécoisolaricirésinol (Ignat et al., 2011; Santhakumar, Battino, & Alvarez-Suarez, 2018).

Tableau 1-2. Les différentes classes des non flavonoïdes (Ignat et al., 2011; Santhakumar et al., 2018).

Classe	Structure	Exemples		
			<u>R1</u>	<u>R2</u>
Acide hydroxybenzoïque		p-Hydroxybenzoïque	H	H
		Protocatéchique	H	OH
		Vanillique	OCH3	H
		Syringique	OCH3	OCH3
		Gallique	OH	OH
Acide hydroxycinnamique		p-Coumarique	<u>R1</u> H	<u>R2</u> H
		Caféique	OH	H
		Férulique	OCH3	H
		Sinapique	OCH3	OCH3
Tannin condensé		Proanthocyanidine		

Tannin hydrolysable		Gallotanin (1,2,3-tri-O-galloyl-β-D-glucose)	
Stilbène		Resvératrol Picéide	R H D-glucose
Lignane		Sécoisolaricirésinol	

1.3.1.3. Les principaux composés phénoliques dans les peaux d'agrumes

Les flavonoïdes les plus abondants dans les peaux d'agrumes sont : hespéridine, néohespéridine, naringine, ériocitrine, néoériocitrine et narirutine (Figure 1-9) (Nakajima, Macedo, & Macedo, 2014; Schieber, Stintzing, & Carle, 2001).

La naringénine (5,7,4'-trihydroxyflavanone) est présente en fortes concentrations dans les agrumes. Elle peut être trouvée sous forme aglycone et/ou glycoside. Parmi ces derniers, la naringine et la narirutine sont particulièrement abondantes. La naringine (naringénine-7-néohespéridoside) est le conjugué de la naringénine avec le néohespéridose (rhamnosyl-alpha-1,2 glucose). Elle est le principal flavonoïde du pamplemousse et se caractérise par son goût amer en raison de son fragment glucose. D'autres espèces d'agrumes comme l'orange amère et le citron vert présentent de faibles quantités de naringine. La narirutine (naringénine-7-rutinoside) est un autre majeur naringénine glycoside, qui possède un fragment rutinose (rhamnosyl-alpha-1,6-glucose). La narirutine est abondante dans le pamplemousse mais dans des quantités moins importantes que la naringine (Khan, 2010; Putnik et al., 2017; Tripoli et al., 2007).

Comme la naringénine, l'hespérétine (4'-méthoxy-5,7,3'-trihydroxyflavanone) et ses glycosides sont également principalement présents dans les agrumes. Les glycosides les plus importants de l'hespérétine sont l'hespéridine et la néohespéridine, qui sont conjugués avec le rhamnosyl-alpha-1,6-glucose et le rhamnosyl-alpha-1,2 glucose, respectivement. L'hespéridine (hespérétine-7-

rutinoside) est présente dans des proportions élevées dans les citrons, les citrons verts, les oranges et les mandarines alors que la néohespéridine est absente dans ces espèces. La néohespéridine (hespérétine-7-néohespéridoside) est principalement présente dans l'orange aigre. Des faibles quantités d'acides phénoliques (acides caféique, férulique, sinapique, coumarique et chlorogénique) peuvent aussi se retrouver dans les peaux d'agrumes (Khan, 2010; Putnik et al. 2017; Tripoli et al. 2007).

Le tableau 1-3 présente les concentrations en polyphénols extraits à partir des peaux d'agrumes par différentes méthodes d'extraction.

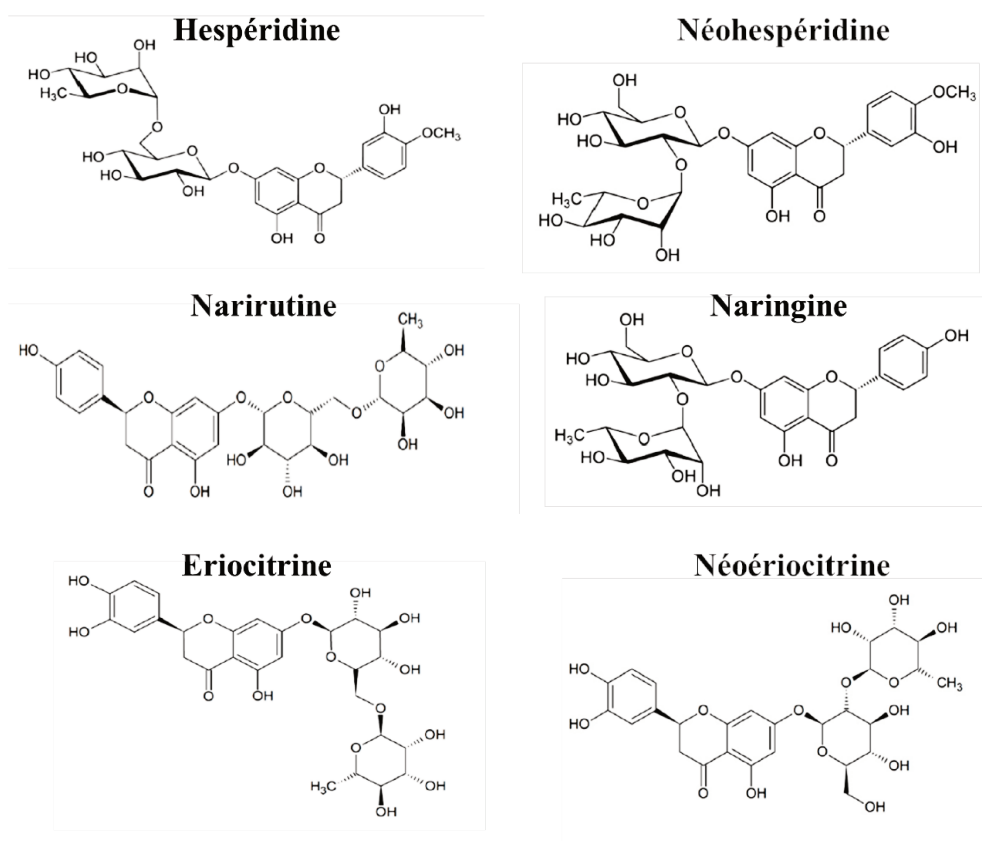


Figure 1-9. Les principaux flavonoïdes présents dans les peaux d'agrumes (Tripoli et al., 2007).

Tableau 1-3. Les concentrations en polyphénols obtenues à partir des peaux d'agrumes par différentes méthodes d'extraction.

Agrume	Concentrations en polyphénols totaux (mg acide gallique équivalent/100g peaux fraîches)	Méthode d'extraction	Origine	Référence
Orange	34,8	Champs électriques pulsés (7 kV/cm ; 20 impulsions) suivis du pressage des peaux à 5 bars pendant 30 min)	Valencia, Espagne	(Luengo, Álvarez, & Raso, 2013)
Orange	200	Ultrasons (40°C, 150 W, 80% éthanol-eau, avec agitation) pendant 10 min	Valencia, Espagne	(Khan, Abert-Vian, Fabiano-Tixier, Dangles, & Chemat, 2010)
Orange	70	Extraction dans 72% éthanol-eau pendant 3 heures	New Zealand	(Li, Smith, & Hossain, 2006a)
Citron	119			
Mandarine	121			
Pamplemousse	161			
Orange	85	Extraction assistée par l'enzyme Celluzyme MX (1.5%) pendant 3 heures	New Zealand	Li, Smith, & Hossain, 2006b)
Citron	95			
Mandarine	135			
Pamplemousse	150			

1.3.1.4. Activités biologiques des composés phénoliques

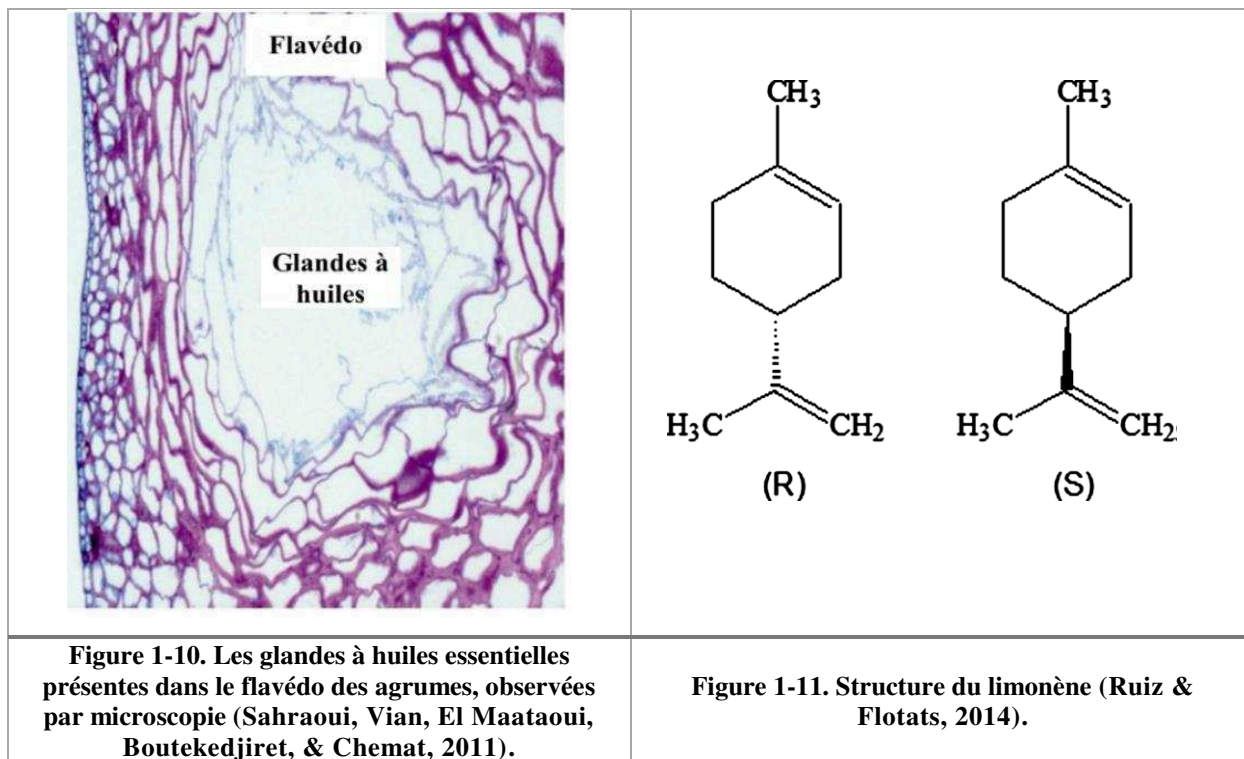
Les composés phénoliques sont caractérisés par leur activité antioxydante. L'oxydation est un facteur principal de détérioration des produits alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. La réaction d'oxydation est causée par l'oxygène atmosphérique, les peroxydes et les oxydes métalliques. Les composés phénoliques ont la capacité de retarder significativement ou d'inhiber l'oxydation d'un substrat (Kumar & Pandey, 2013).

Dans les fluides biologiques, les réactions d'oxydation sont causées par les dérivés radicalaires (ion superoxyde, hydroxyle, peroxyde) ou les dérivés non-radicalaires (eau oxygénée, peroxyde organique, aldéhyde). Les dérivés radicalaires ou radicaux de l'oxygène contiennent au moins un électron libre autour du noyau atomique, ayant une réactivité élevée. Les composés non-radicalaires sont des substances neutres sans électrons libres et très réactives. L'organisme humain doit contrôler en continu la présence de ces composés par un équilibre d'oxydoréduction. Le changement de cet équilibre vers une augmentation de la concentration des espèces d'oxygène est défini comme stress oxydatif. Ce déséquilibre est à l'origine de différentes maladies affectant l'organisme humain telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et les cataractes (Grigoras, 2012). Les composés phénoliques, dépendamment de leur structure ont la capacité d'inhiber les radicaux libres par leur aptitude à céder des atomes d'hydrogène. Leur activité antioxydante est liée à leurs nombres de groupements hydroxyles et leur positionnement par rapport à la fonction carboxyle (Anagnostopoulou, Kefalas, Papageorgiou, Assimopoulou, & Boskou, 2006).

1.3.2. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des composés volatils associés aux arômes et saveurs caractéristiques des plantes. Il s'agit notamment d'hydrocarbures terpéniques (monoterpènes, sesquiterpènes), alcools, esters, aldéhydes, cétones et acides organiques volatils. Les huiles essentielles des agrumes sont localisées dans les cellules ou les glandes de la partie colorée de l'épiderme du fruit (Figure 1-10). Elles se trouvent aussi dans les sacs d'huiles intégrés dans les vésicules du jus. L'hydrocarbure monoterpénique limonène, est le composant majeur des huiles essentielles d'agrumes, représentant une teneur de 80% à 95% de toutes les huiles d'agrumes. Le limonène dont la formule empirique est $C_{10}H_{16}$ est un liquide incolore à température ambiante. Il existe sous forme de deux isomères optiques le D-limonène (ou R-(+)-limonène) et le L-limonène (ou S-(+)-

limonène) (Figure 1-11). Les terpènes oxygénés représentent environ 5% des huiles des agrumes, et fournissent les arômes propres à chaque espèce (Bousbia, 2011; Ruiz & Flotats, 2014).



Le tableau 1-4 présente les pourcentages en huiles essentielles dans les peaux d'agrumes, obtenus par différentes méthodes d'extraction. Comme indiqué dans le tableau, l'hydrodistillation est toujours utilisée comme méthode conventionnelle d'extraction des huiles essentielles. Cependant, cette méthode présente plusieurs désavantages tels que la consommation de grandes quantités de solvants, les durées d'extraction longues (3 heures et plus) et la possibilité de dégradation de la qualité des huiles. Pour cette raison, plusieurs méthodes alternatives ont été mises en place. Parmi ces méthodes, l'hydrodiffusion assistée par microondes et gravité et l'extraction sans solvant assistée par microondes sont les plus utilisées pour l'extraction des huiles essentielles. Ces deux technologies sont détaillées dans la partie 1.4.4.6 de ce chapitre. On remarque que les pourcentages en huiles sont variables non seulement entre les différents agrumes (orange, citron, citron vert), mais aussi au sein d'un même type d'agrumes pour deux variétés différentes. Par exemple, pour deux variétés d'oranges, 0,39% et 4,16% d'huiles sont obtenus par hydrodistillation. Telles différences sont attendues, puisque la teneur en huiles essentielles dans les peaux d'agrumes

dépend de plusieurs conditions climatiques, de transport, de stockage et de prétraitement (Azmir et al., 2013; Bustamante et al., 2016).

Les huiles essentielles extraites sont utilisées comme aromatisant dans les boissons douces ou alcoolisées, en biscuiterie et en confiserie. Dans les produits pharmaceutiques, elles servent à masquer le goût désagréable des médicaments. En parfumerie, elles forment la base de nombreuses compositions, pures ou le plus souvent associées à des molécules synthétiques. Le D-Limonène est aussi utilisé comme solvant vert pour l'extraction des graisses et des huiles (Aissou, Chemat-djenni, & Chemat, 2017).

Tableau 1-4. Les pourcentages en huiles essentielles obtenus à partir des peaux de différents agrumes par différentes méthodes d'extraction.

Agrume	Rendement en huiles essentielles (%= g d'huile/100 g de peaux fraîches)	Méthode d'extraction	Origine	Référence
Orange	2,06	Distillation (dans l'hexane ; 2 heures)	Valencia, Espagne	(Rezzoug & Louka, 2009)
	2	Détente instantanée contrôlée (4 min)		
Orange	0,39	Hydrodistillation (dans l'eau : 3 heures)	Valencia, Espagne	(Ferhat, Meklati, Smadja, & Chemat, 2006)
	0,43	Extraction sans solvant assistée par microondes (30 min)		
Citron vert	1,1	Hydrodistillation (dans l'eau :3 heures)	Algérie	(Bousbia, Vian, Ferhat, Meklati, & Chemat, 2009)
	1	Hydrodiffusion assistée par		

		microondes et gravité (sans solvant : 15 min)		
Orange	4,16	Hydrodistillation (dans l'eau : 4 heures)	Non indiqué	(Boukroufa, Boutekedjiret, Petigny, Rakotomanomana, & Chemat, 2015)
	4,22	Hydrodiffusion assistée par microondes et gravité (sans solvant :15 min)		
Citron	0,05	Pressage à froid (sans solvant)	Algérie	(Ferhat, Meklati, & Chemat, 2007)
	0,21	Hydrodistillation (3 heures)		
	0,24	Extraction sans solvant assistée par microondes (30 min)		

1.3.3. Les fibres alimentaires

1.3.3.1. Les pectines

Les pectines sont des polysaccharides complexes formés principalement d'un squelette d'acides galacturoniques liés par des liaisons alpha (1-4). Les acides galacturoniques peuvent être estérifiés par des acides ou des alcools et liés à des rhamnoses, arabinoses et galactoses. La structure des pectines est très diverse et elle est influencée par les réactions enzymatiques qui ont lieu lors de la croissance et de la maturation des plantes (Nasseri, 2010). Les pectines sont présentes dans la paroi cellulaire primaire et la lamelle moyenne de tous les tissus végétaux. Elles contrôlent la texture et les propriétés rhéologiques des plantes et participent aussi dans leurs mécanismes de défense (Nguémazong, Christiaens, Shpigelman, Van Loey, & Hendrickx, 2015).

Les pectines sont largement utilisées dans les industries alimentaires comme gélifiant, épaississant et stabilisant. Les peaux d'agrumes sont une source importante de pectines. Le pourcentage en pectines dans les peaux d'agrumes sèches est de 25% à 30% (Wang et al., 2015).

1.3.3.2. Les polysaccharides

Les polysaccharides présents dans les résidus d'agrumes sont des polymères hydratés de haut poids moléculaire : la cellulose et l'hémicellulose. La cellulose, de formule moléculaire $(C_6H_{10}O_5)_n$ est un polymère linéaire de glucoses liés par des liaisons bêta-(1-4)- glycosidiques (Figure 1-12). La cellulose est caractérisée par sa structure cristalline, et son degré de polymérisation dépend de la matière végétale (700 à 15 000 unités de glucose) (Kpogbemabou, 2011). Les hémicelluloses sont des hydrates de carbone semblables à la cellulose facilement hydrolysables du fait de leurs structures amorphes. Les hémicelluloses se distinguent de la cellulose par leurs masses molaires nettement plus faible et par la présence de chaînes latérales courtes branchées sur la chaîne polymérique principale. Ce sont des polymères hydrocarbonés constitués d'unités monomériques de sucres associés entre eux par plusieurs types de liaisons glycosidiques. Les monosaccharides incluent les pentoses C_5 (xylose, rhamnose et arabinose), les hexoses C_6 (glucose, mannose et galactose) et les acides uroniques (tels que l'acide 4-O-methyl-glucuronique, l'acide D-glucuronique et l'acide D-galacturonique) (Figure 1-13) (Xun, 2015).

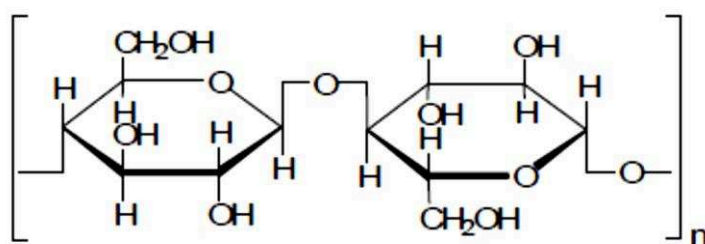


Figure 1-12. Unité de base de la cellulose : glucoses reliés par une liaison bêta -(1-4)- glycosidique (Kpogbemabou, 2011).

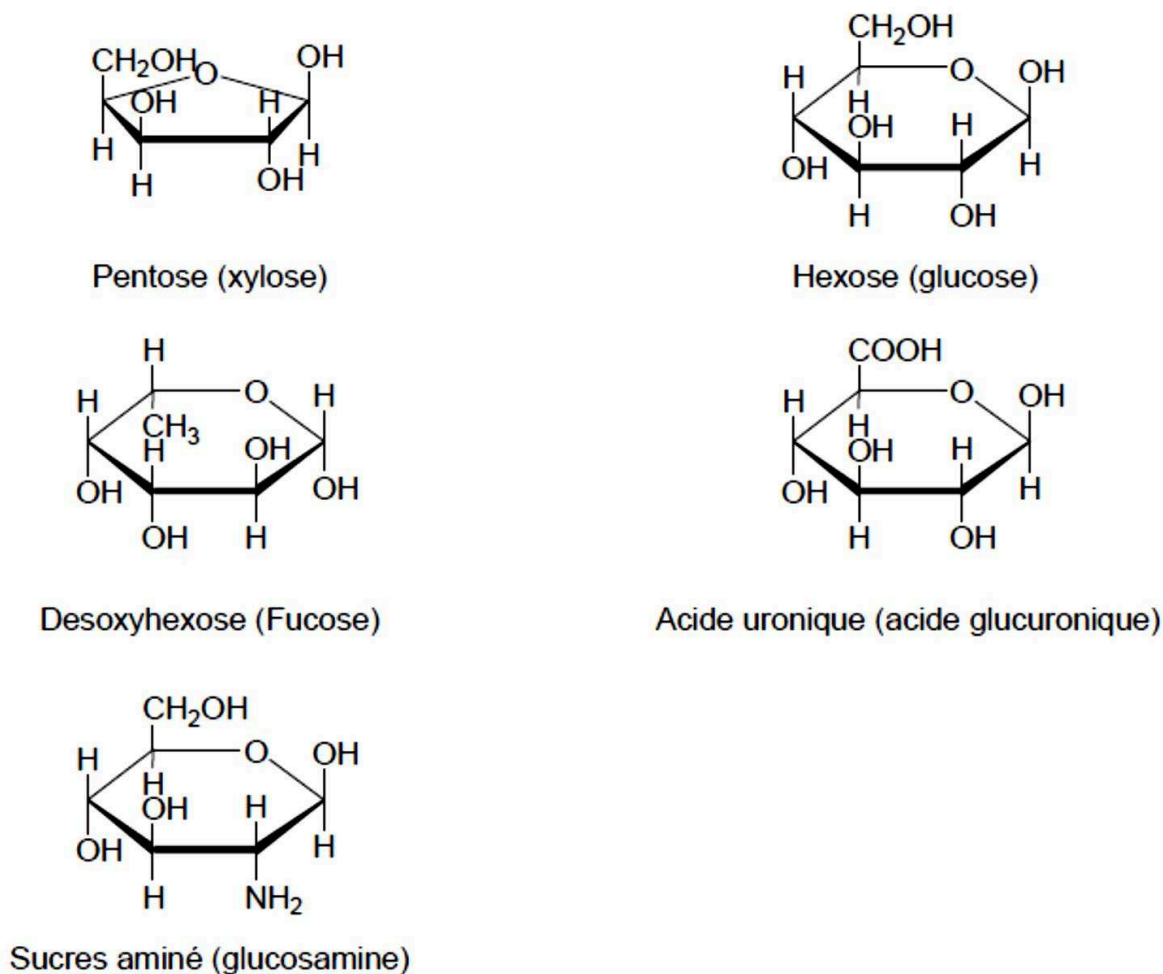


Figure 1-13. Structure des monomères des hémicelluloses (Kpogbemabou, 2011).

Les peaux d'agrumes contiennent 50% à 60% de cellulose et d'hémicellulose et une faible quantité de lignine (Tableau 1-5). Cette composition les rend une matière première importante pour la production du bioéthanol. Généralement, le bioéthanol est obtenu par fermentation microbienne des sucres et des polysaccharides présents dans la matière végétale comme le maïs ou la canne à sucre ou à partir de la biomasse lignocellulosique. La production de bioéthanol et de biogaz à partir des déchets d'agrumes a été étudiée par de nombreux chercheurs (Boluda-Aguilar & López-Gómez, 2013; Choi, Lee, Khanal, Park, & Bae, 2015; Grohmann, Baldwin, & Buslig, 1994; Santi et al., 2014; Satari & Karimi, 2018; Su, Tan, & Xu, 2016; Taghizadeh-Alisaraei, Hosseini, Ghobadian, & Motevali, 2017; Wikandari et al., 2015). Un rendement en bioéthanol de 50 à 60 L/tonne de déchets a été obtenu. Ce rendement est équivalent à 294–352 kWh/tonne de déchets. Cependant l'investissement nécessaire a été élevé : 600 €/ tonne de déchets traités par an. En

termes d'énergie, la production du méthane par digestion anaérobique des déchets d'agrumes a été plus efficace. Le rendement énergétique en méthane était de 1,5 à 2 fois plus élevé que celui du bioéthanol (737–1040 kWh/tonne de déchets) (Pradal, 2016; Ruiz & Flotats, 2014).

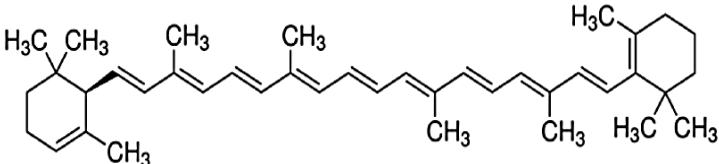
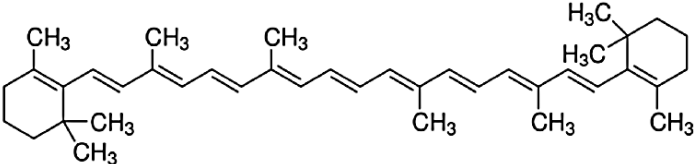
Tableau 1-5. La composition en fibres des coproduits d'agrumes (% Matière sèche) (Putnik et al., 2017).

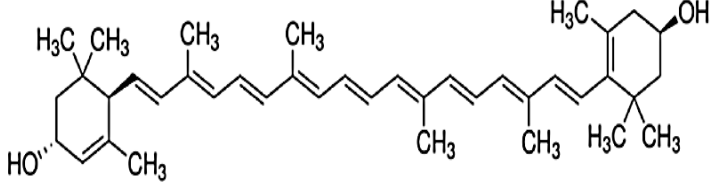
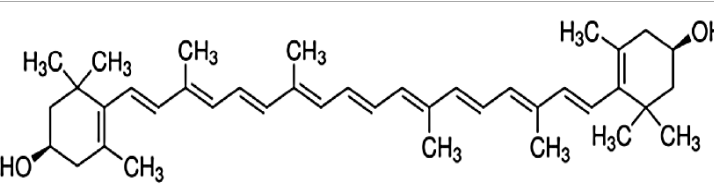
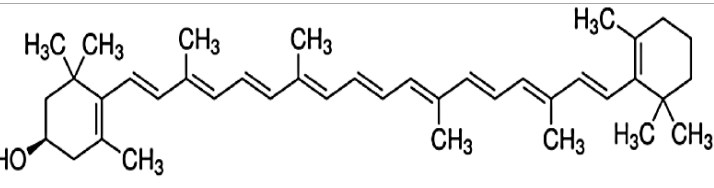
Coproduits d'agrumes	Pectine	Lignine	Cellulose	Hémicellulose
Peaux de citron	13 +/- 1,06	7,56 +/- 0,54	23,06 +/- 2,11	8,09 +/- 0,81
Pulpes de citron	22,53 +/- 1,95	7,55 +/- 0,66	36,22 +/- 3,24	11,05 +/- 1,09
Peaux d'oranges	23,02 +/- 2,12	7,52 +/- 0,59	37,08 +/- 3,1	11,04 +/- 1,05
Pulpes d'oranges	12,07 +/- 1,12	7,51 +/- 0,62	24,52 +/- 2	7,57 +/- 0,66

1.3.4. Les pigments

Les caroténoïdes sont des pigments lipophiles présents dans les peaux d'agrumes. L'extraction de ces pigments permet l'obtention de colorants naturels qui peuvent être utilisés comme additifs alimentaires (Wang et al., 2015). La alpha-carotène, la bêta-carotène, la lutéine, la zéaxanthine et la bêta-cryptoxanthine sont parmi les caroténoïdes les plus abondants dans les peaux d'agrumes (Tableau 1-6).

Tableau 1-6. Structure des différents caroténoïdes (Sharma, Mahato, Cho, & Lee, 2017).

Type	Structure
Alpha-carotène	
Bêta-carotène	

Lutéine	
Zéaxanthine	
Bêta-cryptoxanthine	

1.4. Valorisation des coproduits d'agrumes : extraction des molécules bioactives

L'extraction des molécules bioactives à partir des coproduits d'agrumes suscite un intérêt pour l'obtention de substances naturelles qui peuvent être utilisées dans les aliments et les produits pharmaceutiques et cosmétiques. Cet intérêt est soutenu surtout par les possibles effets nocifs attribués aux substances synthétiques.

1.4.1. Extraction solide-liquide conventionnelle

1.4.1.1. Principe

L'extraction solide-liquide est une opération de transfert ou d'échange de matière entre un solide qui contient les composés à extraire et un solvant liquide. Dans la matière végétale, les molécules d'intérêt sont localisées à l'intérieur des cellules et le transfert se réalise à travers la membrane cellulaire. L'extraction se réalise en quatre étapes principales : la pénétration du solvant à l'intérieur de la cellule par diffusion, la dissolution des molécules d'intérêt dans le solvant, la diffusion du solvant contenant les solutés vers l'extérieur de la cellule à travers la membrane cellulaire et par suite son transfert vers la solution environnante extérieure. La diffusion se réalise quand un gradient de concentration du soluté existe entre les deux phases solide et liquide. Au bout d'un certain moment, un équilibre est atteint (Poirot, 2007). La diffusion dans une matrice solide, dans des conditions non stationnaires est décrite par la seconde loi de Fick :

$$\frac{\delta \bar{C}}{\delta t} = -D \frac{\delta^2 \bar{C}}{\delta r^2} \quad (1.1)$$

où \bar{C} est la concentration du soluté dans la matrice solide, D est le coefficient de diffusion moléculaire (m^2/s), r est la position du soluté dans le solide (m) et t est le temps (s).

1.4.1.2. Les principaux paramètres influençant l'extraction

Les phénomènes de transfert du soluté dans le solide sont affectés par plusieurs facteurs caractérisant le soluté à extraire et le solvant d'extraction, ainsi que par les conditions opératoires.

Influence du solide

La taille et la structure du solide influencent le transfert de la matière. La réduction de la taille des particules améliore le processus de diffusion du solvant et des solutés. La matière végétale a une microstructure complexe formée de cellules, d'espaces intercellulaires, de capillaires et de pores. On peut toutefois tenter de définir et de mesurer les caractéristiques suivantes : la porosité, la tortuosité, la taille et la forme des particules et la surface spécifique d'échange. En effet, plus la matière traitée sera fragmentée, plus la surface d'échange augmente. Les échanges osmotiques seront alors plus importants et le parcours moyen du soluté sera plus petit. C'est pourquoi, dans la pratique, une extraction est généralement précédée d'un prétraitement mécanique de la matière tels que le découpage ou le broyage (Wongkittipong, Prat, Damronglerd, & Gourdon, 2004).

Influence du soluté à extraire

La localisation du soluté et les liaisons qu'il établit avec d'autres composés influencent aussi la diffusion. Les substances à extraire, localisées à l'intérieur des cellules, telles que les sucres simples ou les polyphénols libres se présentent sous forme libre et sont extraites en premier. Tandis que les molécules qui participent à la structure cellulaire, telles que les pectines liées à des phénols ou à d'autres composés ne sont pas extraites facilement. Cependant, les vitesses d'extraction de certains composants peuvent être classées dans l'ordre croissant suivant : acides acétiques > sucres > phénols > pectines (Poirot, 2007).

Influence des solvants d'extraction

Les solvants d'extraction sont choisis selon la nature et la solubilité des composés à extraire. La plupart des composés bioactifs cibles sont utilisés dans les industries alimentaires et pharmaceutiques. Pour cette raison, il existe certaines exigences pour le choix du solvant d'extraction. Il doit être stable, sélectif, peu visqueux, recyclable si possible, peu coûteux et inoffensif pour l'environnement. Les alcools sont généralement utilisés dans les procédés

d'extraction. La présence d'un groupement hydroxyle et d'une partie aliphatique permettent aux alcools la solubilisation des composés polaires ou de polarité intermédiaire. Parmi les alcools, l'éthanol est un solvant peu coûteux, recyclable et cité comme GRAS (Generally Recognized As Safe) par la FDA (Food and Drug Administration). Selon la polarité des composés à extraire, l'eau peut être ajoutée à l'éthanol pour modifier sa polarité. Le méthanol est un solvant efficace pour l'extraction de certains composés phénoliques tels que les acides férulique, vanillique, syringique et sinapique. Par contre, le méthanol est un solvant toxique et doit être complètement éliminé des extraits. Différents problèmes sont associés à l'utilisation de ces solvants. La plupart des solvants organiques utilisés dans l'extraction sont inflammables, très volatils et toxiques (cancérogènes, mutagènes). Les solvants organiques volatils présents dans l'atmosphère ont des impacts négatifs sur l'environnement et peuvent contribuer au réchauffement climatique (Galanakis, 2012). Dans l'industrie alimentaire ou pharmaceutique, le choix du solvant est très important. Les normes et les règles d'hygiène et de sécurité sont très strictes. Le solvant ne doit pas rester dans les produits finaux, ou bien les traces restantes doivent être suffisamment insignifiantes pour être inoffensives. Le choix est souvent restreint à un groupe de solvants qui sont connus, maîtrisés et acceptables.

Influence de la température

L'augmentation de la température diminue la viscosité du solvant et augmente la perméabilité des parois cellulaires. Elle favorise l'éclatement des cellules et par suite la diffusivité du soluté vers le solvant d'extraction. Cependant, l'augmentation de la température est limitée par le risque de dégradation thermique des composés à extraire (Linares, Hase, Vergara, & Resnik, 2010).

Influence de l'agitation

Une agitation mécanique des particules dans le solvant permet le maintien en suspension de celles-ci et l'homogénéisation du milieu. Elle limite la surconcentration des molécules au voisinage de la surface des solides et diminue par la suite le gradient de concentration entre l'intérieur et l'extérieur du solide. L'agitation a donc une grande influence sur le transfert de matière à l'interface solide-liquide (Cissé, 2010).

1.4.1.3. Applications

L'extraction solide-liquide est la méthode conventionnelle utilisée pour l'extraction des molécules d'intérêt. Plusieurs solvants ont été utilisés pour l'extraction des polyphénols à partir des peaux d'oranges. Les rendements maximaux en polyphénols totaux et en flavonoïdes ont été obtenus en

utilisant les solvants suivants et dans un ordre décroissant : éthanol>méthanol>acétone>dichlorométhane>éthylacétate>hexane (Hegazy & Ibrahim, 2012). Plusieurs paramètres tels que le solvant d'extraction et la température ont été variés pour maximiser l'extraction des polyphénols à partir des peaux d'agrumes. Parmi les peaux d'agrumes testées, les pamplemousses contiennent la concentration la plus élevée en polyphénols ($161,60 \pm 17,36$ mg GAE/100 g de peau fraîche), suivis des mandarines ($121,14 \pm 11,89$ mg GAE/100 g de peau fraîche), des citrons ($118,95 \pm 9,35$ mg GAE/100 g de peau fraîche) et des oranges ($73,59 \pm 5,43$ mg GAE/100 g de peau fraîche). Ces rendements ont été obtenus avec 72% éthanol-eau et à 80°C (Li et al., 2006a).

1.4.2. Extraction solide-liquide dans les solvants verts

L'extraction solide-liquide nécessite l'utilisation de solvants capables de solubiliser les composés à extraire. Généralement les solvants utilisés sont coûteux, toxiques et/ou inflammables (méthanol, acétone, acétate d'éthyle). Pour cette raison, après le procédé d'extraction, une étape d'élimination de ces solvants est nécessaire pour l'utilisation des extraits dans les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. En conséquence, le domaine de recherche de nouveaux solvants verts, alternatifs est en nette augmentation. Selon les principes de la chimie verte, la sélection d'un solvant approprié dépend de plusieurs paramètres :

- La sécurité des travailleurs (toxicité, cancérogénicité, mutagénicité, absorption à travers la peau et le système respiratoire).
- La sécurité du processus (inflammabilité, explosivité, volatilité, création du potentiel peroxyde).
- La protection de l'environnement (écotoxicité, persistance, contamination des eaux souterraines, destruction de la couche d'ozone).
- La durabilité du processus (la capacité de recyclage et la possibilité de réutilisation du solvant).
- Le solvant vert doit donc être chimiquement et physiquement stable, ayant une faible volatilité et une faible toxicité, facile à utiliser sans la nécessité de l'évaporer après l'étape d'extraction, facile à recycler et facilement biodégradable dans l'environnement (Herrero & Ibañez, 2018).

1.4.2.1. Extraction solide-liquide dans les solvants eutectiques profonds

Durant la recherche des solvants verts, appropriés pour l'extraction des molécules bioactives, les solvants eutectiques profonds (en anglais Deep Eutectic Solvents, DES) ont émergé. Ils sont de plus en plus utilisés pour remplacer les solvants organiques. Ces solvants ont plusieurs avantages. Ils sont biodégradables, formés à partir de composés renouvelables, naturels et non toxiques. Ils ont une volatilité négligeable à température ambiante, sont miscibles avec l'eau et ininflammables. Ils ne sont pas chers et leur préparation est simple. La synthèse d'un solvant eutectique profond consiste à mélanger un accepteur d'un pont d'hydrogène (généralement le choline-chloride) avec un donneur d'un pont d'hydrogène (ions, acides aminés, acides carboxyliques, sucres...). Les deux composés s'associent par un pont d'hydrogène (Figure 1-14). Le mélange est dit eutectique vu qu'il a une faible température de fusion et qu'il est liquide même à des faibles températures (García, Rodríguez-Juan, Rodríguez-Gutiérrez, Rios, & Fernández-Bolaños, 2016).

Applications

Récemment les solvants eutectiques profonds sont utilisés comme solvants verts dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques grâce à leurs propriétés de solubilisation (Huang et al., 2017). Ils ont été efficaces dans l'extraction des molécules bioactives telles que les composés phénoliques à partir des peaux de raisins (Bubalo, Ćurko, Tomašević, Kovačević Ganić, & Radojčić Redovniković, 2016), de l'huile d'olive (García et al., 2016), des produits à base de soja (Bajkacz & Adamek, 2017) et des plantes médicinales (Bakirtzi, Triantafyllidou, & Makris, 2016; Bi, Tian, & Row, 2013; Duan et al., 2016). Le principe d'extraction avec les solvants eutectiques profonds se base sur les interactions et les liaisons par pont d'hydrogène qui se forment entre les composants du solvant et les molécules cibles. À notre connaissance, les solvants eutectiques profonds n'ont pas été testés pour l'extraction des polyphénols à partir des coproduits d'agrumes.

L'efficacité de l'extraction par les solvants eutectiques profonds dépend de la stabilité du solvant, sa polarité et sa viscosité. La stabilité du solvant est influencée par le ratio molaire de ses composants. Le nombre de groupements donneurs ou accepteurs de liaisons hydrogènes, la structure spatiale de ces groupements et la position des liaisons influencent de manière significative la formation et la stabilité du solvant eutectique profond. La polarité du solvant affecte ses capacités de solubilisation. Les solvants à base d'acides organiques sont les plus polaires suivis par les solvants à base d'acides aminés et de sucres qui ont une polarité similaire à celle de l'eau. Les solvants à base d'alcool ont une polarité similaire à celle du méthanol (Dai, van Spronsen,

Witkamp, Verpoorte, & Choi, 2013). La viscosité du solvant peut être ajustée en ajoutant un certain pourcentage d'eau. La diminution de la viscosité du solvant améliore sa capacité de solubilisation des molécules cibles. Cependant une concentration excessive en eau peut diminuer les interactions entre le solvant et les molécules cibles (Bi, Tian, & Row, 2013).

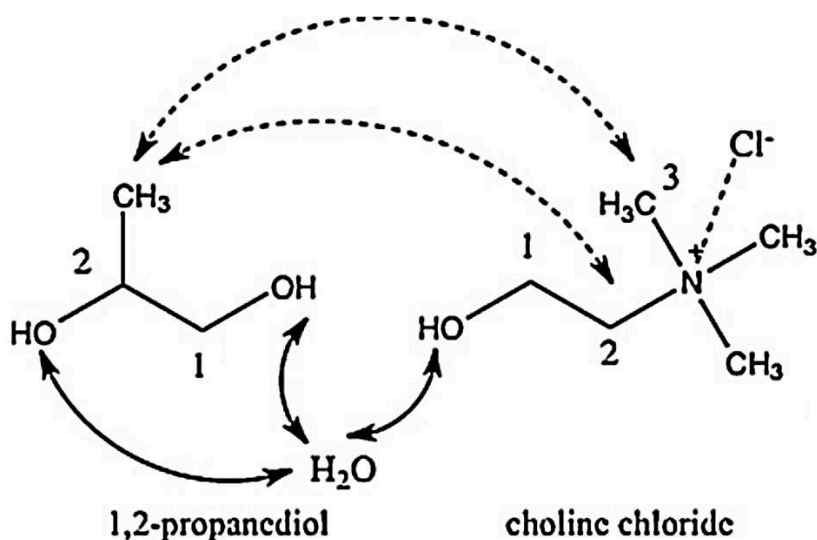


Figure 1-14. Les liaisons se formant entre deux composants d'un solvant eutectique profond (Dai, van Spronsen, Witkamp, Verpoorte, & Choi, 2013).

1.4.2.2. Extraction solide-liquide dans le glycérol

L'eau est le solvant vert le plus connu, qui présente plusieurs avantages tels que sa haute disponibilité et son faible coût. Cependant, l'eau n'est pas toujours le meilleur solvant pour l'extraction des molécules bioactives. Sa capacité d'extraction dépend de la nature des molécules d'intérêt. Dans certains cas, il est nécessaire de prétraiter la matière première ou de passer à des conditions opératoires extrêmes (températures élevées, longues durées d'extraction) pour améliorer l'extraction dans l'eau. Le glycérol, une substance naturelle, non toxique et peu coûteuse est présente naturellement dans les aliments. Pour cette raison, le glycérol peut être utilisé avec l'eau, comme co-solvant vert pour améliorer l'extraction. Il peut changer la constante diélectrique de l'eau. La polarité du milieu serait donc modifiée, ce qui peut améliorer l'extraction de certains composés bioactifs (Bubalo et al., 2016; Häckl & Kunz, 2018).

Applications

L'utilisation de 10% de glycérol dans l'eau, a permis d'augmenter les rendements en polyphénols extraits à partir de la plante *Hypericum perforatum* de 71 mg GAE/g MS (en utilisant l'éthanol

pur) jusqu' à 86 mg GAE/g MS (Karakashov, Grigorakis, Loupassaki, & Makris, 2015). La densité du glycérol est supérieure à celle de l'eau, ce qui peut augmenter la viscosité du mélange glycérol/eau et diminuer la diffusion des molécules. C'est pour cette raison qu'il est indispensable d'augmenter la température durant l'extraction dans le mélange glycérol-eau. Des études ont montré un effet conjugué du pourcentage glycérol-eau de 9,3% avec la température de 80°C par rapport à 60% éthanol-eau à une température de 24°C pour l'extraction des polyphénols à partir des feuilles d'olivier. Les rendements en polyphénols totaux ont augmenté de 45 mg GAE/g MS (60% éthanol-eau à 24°C) jusqu'à 51,91 mg GAE/g MS (9,3% glycérol-eau à 80°C). De plus, l'analyse par chromatographie en phase liquide et spectroscopie de masse, a montré que le profil des polyphénols obtenu dans le mélange glycérol-eau (figure 1-15a) est significativement différent de celui obtenu dans le mélange hydroéthanolique (Figure1-15b). Le mélange glycérol-eau a facilité l'extraction de molécules plus polaires (indiquées dans le cadre du chromatogramme de la figure 1-15a), par rapport au mélange hydroéthanolique (chromatogramme de la figure 1-15b). Les composés qui étaient quasiment absents ou présents en très faible concentration dans les extraits éthanol-eau ont été extraits dans le solvant glycérol-eau. Les constituants typiques des feuilles d'olivier ont été détectés dans les deux extraits. Ceci montre que le mélange glycérol-eau donne un accès à une très large gamme de molécules (Apostolakis, Grigorakis, & Makris, 2014).

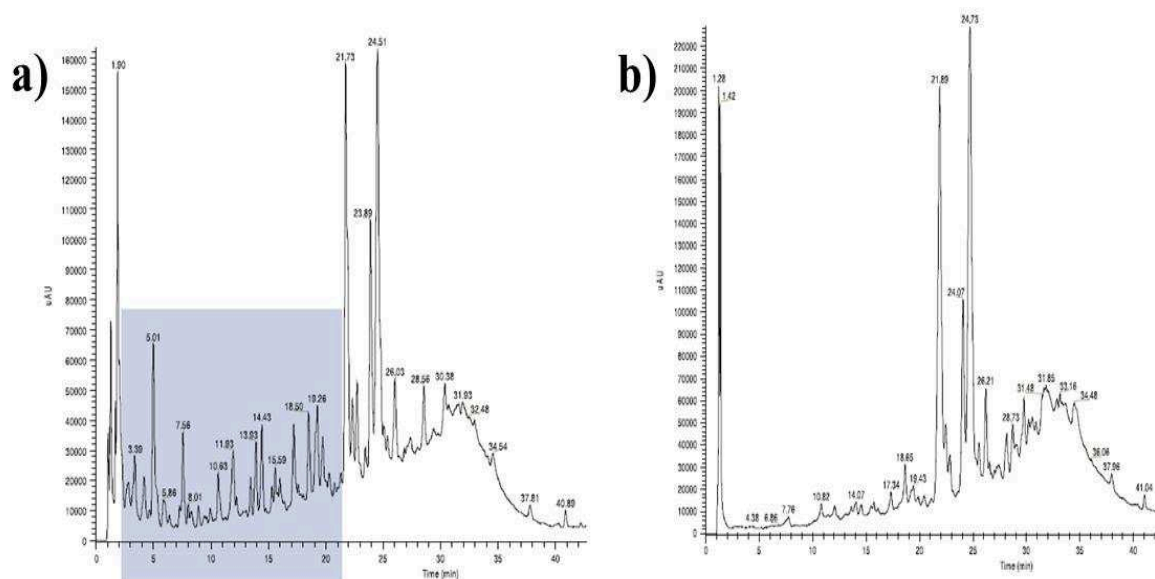


Figure 1-15. Profil des polyphénols a) dans le mélange glycérol-eau (9,3%) et b) dans le mélange éthanol-eau (60%) (Apostolakis et al., 2014).

1.4.3. Extraction solide-liquide assistée par les enzymes

Souvent la présence des structures cellulaires persistantes constitue une barrière pour l'extraction solide-liquide des composés bioactifs. Par exemple, la plupart des composés phénoliques sont piégés dans les polysaccharides de la paroi cellulaire comme la cellulose, l'hémicellulose et la pectine et sont liés par des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogènes (Figure 1-16). D'autres acides phénoliques forment des liaisons éthers avec la lignine à travers leur groupement hydroxyle de leur cycle aromatique, et des liaisons esters avec les sucres et les protéines à travers leur groupement carboxyle. Dans le cas des flavonoïdes, ils sont liés par des liaisons glycosidiques covalentes avec des fragments de sucres, à travers un groupement OH (O-glycosides) ou par des liaisons carbone-carbone (C-glycosides). Les tannins ont tendance à former de forts complexes avec les protéines.

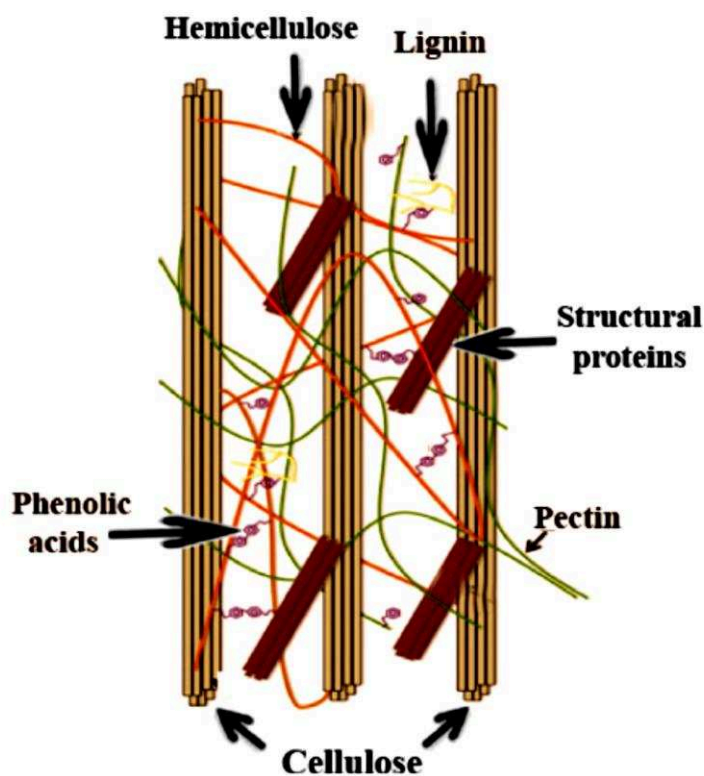


Figure 1-16. Les molécules constituant la paroi cellulaire végétale (Nadar et al., 2018).

Les enzymes comme la cellulase, l'hémicellulase, la pectinase et la protéase qui sont utilisées pour solubiliser la paroi cellulaire végétale, accélérant ainsi la libération des biomolécules intracellulaires. L'extraction assistée par les enzymes constitue donc une alternative à l'extraction solide-liquide conventionnelle. La dégradation enzymatique des polymères de la paroi cellulaire facilite la libération des composés bioactifs tels que les composés phénoliques. L'extraction assistée par les enzymes permet de réduire l'utilisation des solvants ainsi que la durée d'extraction. Selon l'enzyme utilisée, l'extraction est réalisée à un pH et une température optimaux (Nadar, Rao, & Rathod, 2018).

Applications

La cellulase a été utilisée pour l'extraction des polyphénols à partir de différents peaux d'agrumes. La figure 1-17 montre que toutes les enzymes testées à une concentration de 1,5%, ont augmenté l'extraction des polyphénols par rapport à l'extraction solide-liquide conventionnelle dans l'eau (Li et al., 2006b).

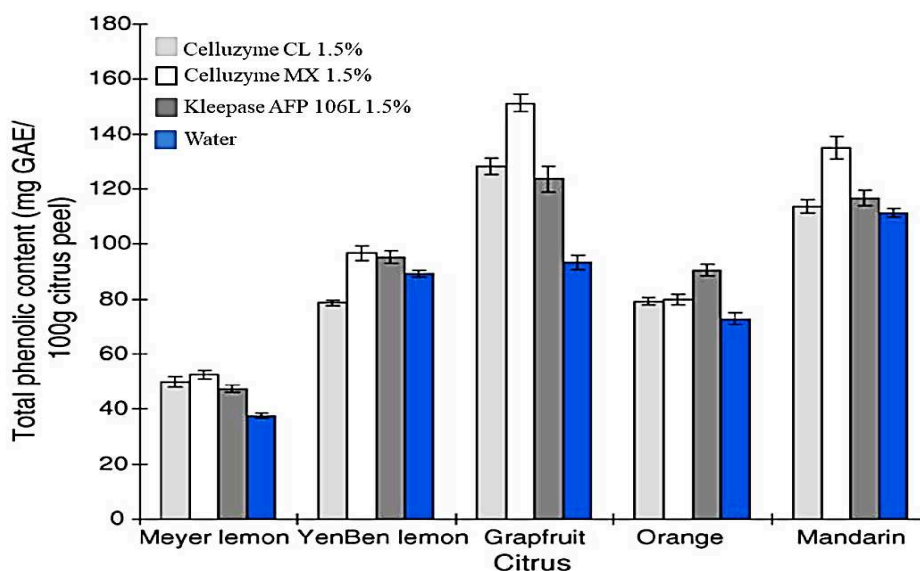


Figure 1-17. L'effet des différentes enzymes sur l'extraction des polyphénols à partir des peaux d'agrumes (Li et al., 2006b).

Vu la présence de plusieurs polysaccharides dans la paroi cellulaire, l'utilisation d'un mélange d'enzymes est souvent utilisé pour la libération des molécules d'intérêt. Les enzymes commerciales disponibles sont composées d'un mélange de plusieurs enzymes. Les effets coopératifs de plusieurs enzymes peuvent entraîner une augmentation de la dégradation des parois cellulaires, entraînant des rendements d'extraction plus élevés. Comme c'est le cas pour la Viscozyme L qui est un mélange enzymatique constitué d'arabanase, de cellulase, de β -glucanase, d'hémicellulase et de xylanase (Zheng, Hwang, & Chung, 2009).

1.4.4. Technologies d'extraction innovantes

Plusieurs technologies innovantes (ultrasons, microondes, champs électriques pulsés...) ont été mises en place pour réduire les consommations d'énergie et améliorer les processus d'extraction. Ces technologies répondent au principe de l'extraction verte. Ce principe consiste à minimiser l'utilisation des solvants organiques, diminuer la température et la durée d'extraction, améliorer les rendements d'extraction et la qualité de l'extrait (Barba, Zhu, Koubaa, Sant'Ana, & Orlie, 2016). Dans la plupart des cas, l'eau est utilisée comme solvant et dans certaines technologies comme les microondes, aucune utilisation de solvant n'est nécessaire. Dans la suite, nous allons exposer les principales technologies innovantes d'extraction qui ont été utilisées durant cette thèse.

1.4.4.1. Les champs électriques pulsés

1.4.4.1.1. Mécanisme d'action

Les champs électriques pulsés (CEP) sont une technique qui permet la perméabilisation des membranes cellulaires grâce au phénomène de l'électroporation. Un champ électrique E est appliqué entre deux électrodes planes. L'intensité du champ électrique peut varier de 100 V/cm jusqu'à 40 kV/cm, selon la nature des cellules traitées et selon l'application envisagée. Des charges s'accumulent de part et d'autre de la membrane et un potentiel transmembranaire V_m apparaît (Figure 1-18). Suite à l'attraction entre les charges de signes opposés, la membrane se comprime. Une force élastique s'oppose à cette force électro-compressive. Lorsque le champ électrique appliqué devient supérieur à une valeur critique, la force électro-compressive dépasse la force élastique, et des pores se forment au niveau de la membrane, d'où le phénomène de l'électroporation. Pour une cellule sphérique de rayon a , le potentiel transmembranaire V_m induit par le champ électrique E est déterminé par l'équation 1.2.

$$V_m = 1,5 * a * E * \cos \theta \quad (1.2)$$

Avec θ l'angle formé entre la direction du champ électrique et le vecteur normal de la cellule au point m considéré.

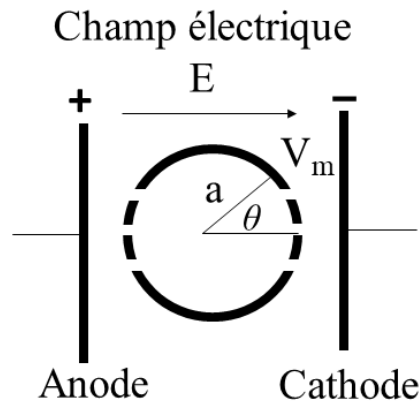


Figure 1-18. Potentiel électrique V_m en un point m de la surface d'une cellule.

En fonction de l'intensité du champ électrique appliqué et de la durée du traitement, la formation des pores peut être réversible (ouverture puis fermeture des pores) ou irréversible (les pores restent ouverts) avec un endommagement complet de la membrane (Vorobiev & Lebovka, 2008). Les effets des CEP sur une cellule peuvent être décrits en quatre étapes :

- Formation du potentiel transmembranaire à travers la membrane cytoplasmique grâce à l'accumulation d'ions de charges opposées de part et d'autre de la membrane.
- Réduction de l'épaisseur de la membrane et formation des pores grâce à l'attraction entre les ions.
- Changement du nombre et de la taille des pores formés durant le traitement.
- Libération des composés intracellulaires grâce à la formation irréversible des pores dans la membrane cellulaire.

1.4.4.1.2. Equipement de traitement

L'installation électrique pour le traitement par les CEP est composée d'un générateur d'impulsions de haute tension, d'un ou de plusieurs condensateurs, d'un commutateur et de deux électrodes. L'énergie délivrée par le générateur est temporairement emmagasinée par un ou plusieurs condensateurs montés en parallèle. Cette énergie est ensuite déchargée aux bornes des électrodes via un commutateur. La durée de chaque impulsion est de l'ordre des microsecondes.

1.4.4.1.3. Les principaux paramètres influençant le traitement par les CEP

L'efficacité du traitement par les CEP dépend de plusieurs paramètres tels que l'intensité du champ électrique, la forme des impulsions, la durée du traitement, la température du milieu, les caractéristiques physico-chimiques de la matrice à traiter (pH, conductivité), la taille et la forme des cellules traitées. Les principaux paramètres qui influencent le traitement par les CEP seront abordés dans les paragraphes suivants.

Intensité du champ électrique

Le champ électrique E (V/cm) délivré au produit placé entre les deux électrodes est défini par $E=U/d$. U étant la tension entre les électrodes (V) et d la distance entre les électrodes (en cm). La formation des pores (réversible ou irréversible) dans la membrane cellulaire dépend de l'intensité du champ électrique appliqué (Figure 1-19).

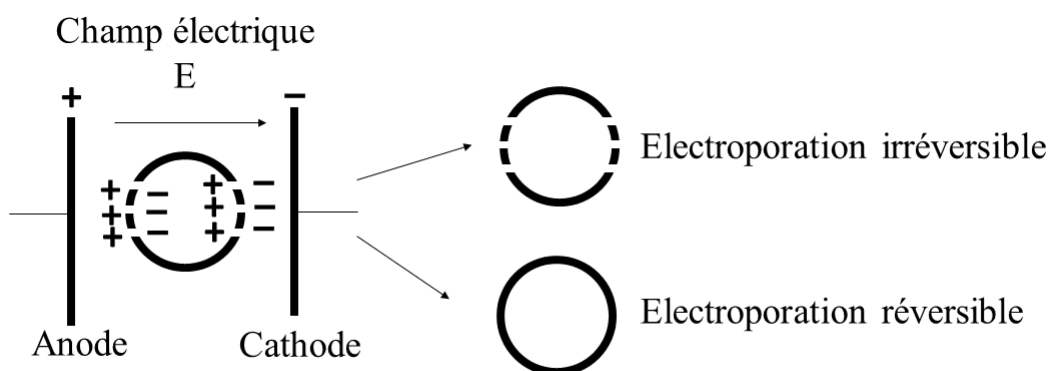


Figure 1-19. Schématisation de l'électroporation réversible et irréversible.

Dans certaines applications biotechnologiques, l'électroporation réversible est nécessaire pour préserver la viabilité de la cellule. D'autres applications, comme l'inactivation des microorganismes ou l'augmentation du transfert de masse par les CEP, nécessitent une électroporation irréversible. Il existe une intensité critique à partir de laquelle la perméabilisation des membranes cellulaires commence (Vorobiev & Lebovka, 2008). Les champs électriques $E < 0.1$ kV/cm sont considérés comme des champs électriques de faible intensité, ceux qui sont entre 0,1 et 3 kV/cm sont modérés et ceux qui sont entre 3 et 5 kV/cm sont considérés comme des champs électriques de forte intensité. A titre d'exemple, la perméabilisation des cellules eucaryotes pour l'amélioration du transfert de masse, peut s'effectuer à des champs électriques faibles et modérés

pour des durées allant de 100 à 1000 μs ou à des champs électriques élevés pour une durée de traitement plus courte (Puértolas et al., 2012).

La durée du traitement et la forme des impulsions

La durée du traitement t_{CEP} correspond au nombre d'impulsions n appliqué durant le traitement électrique multiplié par la durée d'une impulsion t_i . Dépendamment de l'installation électrique, la forme des impulsions générées peut être rectangulaire monopolaire, rectangulaire bipolaire, oscillatoire ou exponentielle. Les impulsions les plus utilisées pour l'électropéabilisation cellulaire sont les impulsions rectangulaires unipolaires et exponentielles (Grimi, 2009; Vorobiev & Lebovka, 2008). La figure 1-20 schématise ces impulsions ainsi que les circuits électriques correspondants. Pour les impulsions rectangulaires, l'énergie électrique est délivrée à la tension maximale durant la quasi-totalité de chaque impulsion. Les impulsions exponentielles nécessitent un temps de « remise à zéro » relativement long. La durée de l'impulsion exponentielle est définie comme étant le temps nécessaire pour diminuer la tension de 37% de sa valeur maximale.

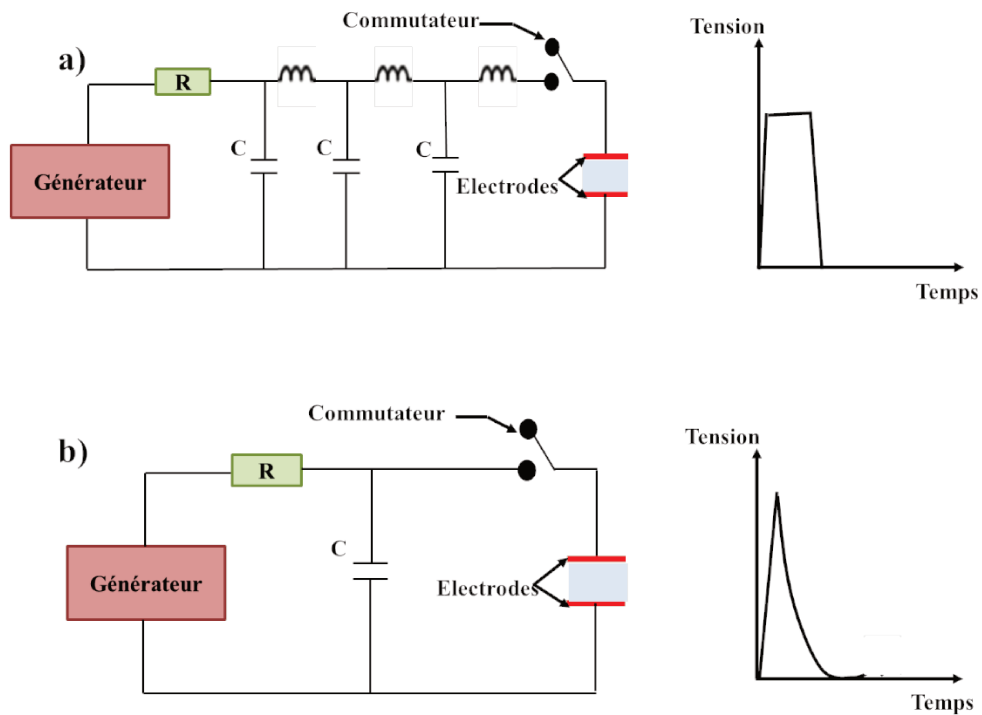


Figure 1-20. Schématisation des circuits électriques permettant la génération des impulsions électriques rectangulaires (a) et exponentielles (b).

La figure 1-21 montre l'indice de perméabilisation Z des cossettes de pommes en fonction de la durée totale des CEP, pour des durées d'impulsions allant de $10 \mu\text{s}$ jusqu'à $1000 \mu\text{s}$ à une température de 20°C . L'effet des CEP est plus important pour des durées d'impulsions plus élevées. Pour une faible durée d'impulsion ($t_i = 10 \mu\text{s}$), le temps nécessaire pour le chargement de la membrane n'est pas atteint et l'effet des CEP est donc négligeable. La création des pores dans la membrane cellulaire a lieu quand le potentiel transmembranaire V_m augmente et atteint une certaine valeur (généralement entre $0,2$ et 1 V) (de Vito, Ferrari, Lebovka, Shynkaryk, & Vorobiev, 2008). La durée des impulsions doit être supérieure à la durée de chargement de la membrane. Dans certains cas, il est donc nécessaire d'augmenter la durée des impulsions. Cependant, une augmentation de la durée du traitement par les CEP conduit à une élévation des coûts énergétiques.

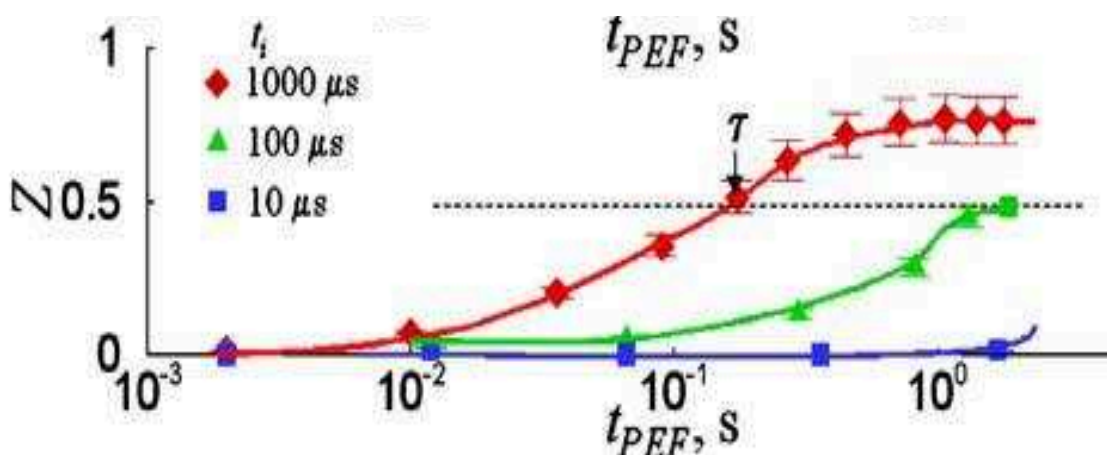


Figure 1-21. L'indice de désintégration Z des cossettes de pommes en fonction de la durée du traitement par les CEP, pour différentes durées d'impulsions $t_i=10 \mu\text{s}$, $100 \mu\text{s}$ et $1000 \mu\text{s}$. τ représente le temps caractéristique d'endommagement cellulaire (de Vito, Ferrari, Lebovka, Shynkaryk, & Vorobiev, 2008).

Le nombre d'impulsions

La figure 1-22 montre l'effet du nombre d'impulsions appliqué durant les CEP sur l'augmentation du rendement en jus de pommes. Après une première étape de pressage des pommes, les CEP ont été appliqués sur les cossettes de pommes, à une tension de 1000 V et le nombre d'impulsions a été varié de 1 à 1000 . Une deuxième étape de pressage a été effectuée après l'application des CEP, dans le but d'obtenir un rendement en jus supplémentaire. Il est clair que l'augmentation du nombre d'impulsions a amélioré le rendement en jus supplémentaire obtenu après la deuxième étape de pressage. Ces courbes sont comparées avec la courbe de rendement en jus supplémentaire

obtenu après la deuxième étape de pressage à haute pression (30 bars) mais sans traitement avec les CEP (Bazhal & Vorobiev, 2000).

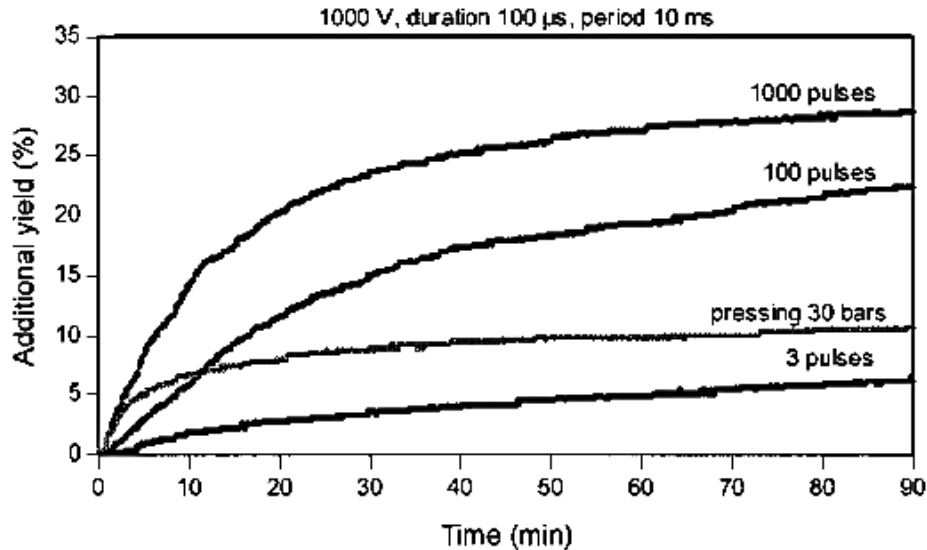


Figure 1-22. Le rendement en jus de pomme supplémentaire obtenu en fonction du temps de pressage (à 30 bars), sans CEP et après l'application des CEP à des nombres d'impulsions différents (Bazhal & Vorobiev, 2000).

La température

Généralement le traitement par les CEP s'effectue à température ambiante. Cependant, l'augmentation de la température peut influencer l'endommagement cellulaire induit par les CEP. La figure 1-23 montre le temps caractéristique pour l'endommagement des cellules de pommes de terre en fonction de l'intensité du champ électrique appliqué durant les CEP. Pour les champs électriques inférieurs à 100 V/cm, à une température de 22°C, l'effet de l'électroporation sur les pommes de terre est perceptible pour des durées de traitement de l'ordre de 10 à 1000 s. Alors qu'à une température de 49°C, une durée de traitement moins élevée de l'ordre de 0.01 jusqu'à 1 s est nécessaire. L'augmentation de la température agit sur les propriétés thermodynamiques de la membrane, ce qui facilite l'apparition des pores durant le traitement par les CEP (Lebovka et al., 2005).

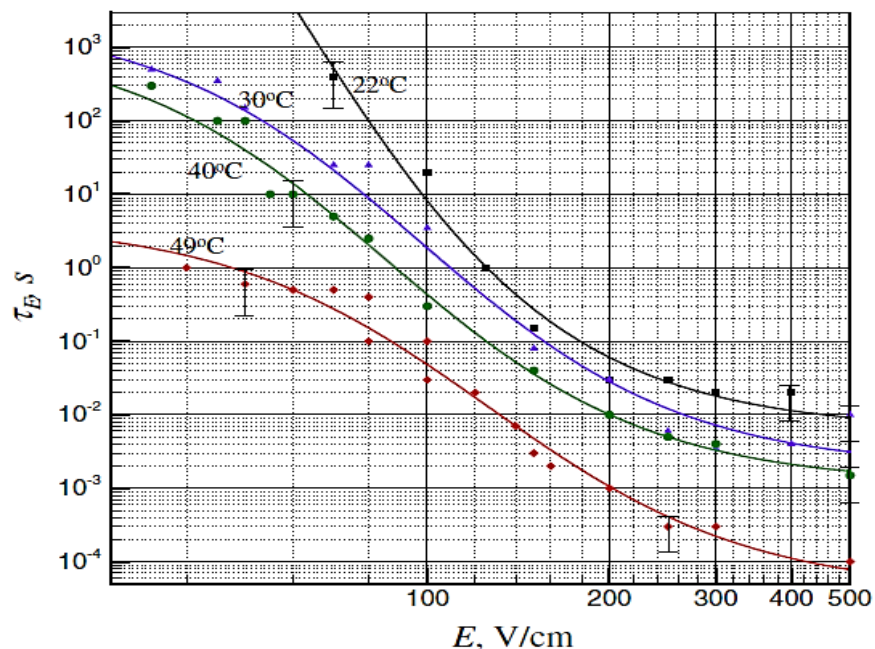


Figure 1-23. Le temps caractéristique pour l'endommagement cellulaire des pommes de terre en fonction de l'intensité des CEP à des températures différentes (Lebovka et al., 2005).

1.4.4.1.4. Applications

La technique des CEP est appliquée en biotechnologie et en médecine pour l'injection des médicaments ou des gènes dans les cellules vivantes. Elle est aussi utilisée pour l'inactivation des microorganismes et la conservation non thermique des aliments. Le prétraitement des produits alimentaires par les CEP a permis l'amélioration des processus de séchage, de pressage et de diffusion sans toutefois dégrader les vitamines, les pigments et les molécules bioactives (Teissié et al., 2002).

La perméabilisation des membranes cellulaires par les CEP a permis d'améliorer l'extraction des molécules bioactives à partir de différentes matières premières telles que les écorces de papaye (Parniakov, Barba, Grimi, Lebovka, & Vorobiev, 2014), les écorces de mangue (Parniakov, Barba, Grimi, Lebovka, & Vorobiev, 2016), les sarments de vigne (Rajha, Boussetta, Louka, Maroun, & Vorobiev, 2014) et les pépins de raisins (Boussetta et al., 2012).

Les CEP ont été appliqués sur les peaux d'oranges pour améliorer l'extraction des polyphénols par pressage. Après 30 min de pressage à 5 bars, le rendement total en polyphénols a augmenté de 20%, 129%, 153% et 159% pour des peaux d'oranges traités avec les CEP à 1, 3, 5 et 7 kV/cm,

respectivement. Le traitement des peaux d'oranges par les CEP a permis aussi d'augmenter l'activité antioxydante des extraits obtenus après pressage (Luengo et al., 2013).

L'application des CEP sur la matière végétale avant ou pendant le pressage a permis d'améliorer les rendements en jus et les qualités nutritionnelle et organoleptique des jus (Bazhal & Vorobiev, 2000; Bobinaité et al., 2015; Grimi et al., 2007; Jaeger et al., 2012; Praporscic, Lebovka, Vorobiev, & Mietton-Peuchot, 2007; Turk et al., 2012). Le pressage des myrtilles sans traitement a donné un rendement en jus égal à 42,7%. Le prétraitement des myrtilles par les CEP avant pressage, à une intensité de 1 kV/cm a permis une augmentation significative du rendement en jus jusqu'à 55%. L'augmentation de l'intensité des CEP de 1 kV/cm jusqu'à 3 kV/cm a conduit à une légère augmentation du rendement en jus, qui atteint une valeur maximale de 56,3%. Cependant, le rendement en jus diminue de 56,3% à 52,9% quand l'intensité des CEP augmente de 3kV/cm jusqu'à 5 kV/cm. Un tel résultat peut s'expliquer par le compactage et la fermeture des capillaires dans le gâteau de pressage, pour une valeur élevée de l'intensité des CEP. Le contenu en polyphénols du jus obtenu à partir des myrtilles non traitées est de 75 mg GAE/100 mL. Ce contenu a augmenté jusqu'à 110 mg GAE/100 mL quand les fruits ont été prétraités par les CEP, à une intensité de 3 kV/cm (Bobinaité et al., 2015). Le prétraitement des raisins par les CEP à une intensité de 0,75 kV/cm a augmenté le rendement en jus de 49% à 76% (Praporscic et al., 2007). Le rendement en jus de pommes a aussi augmenté de 45% jusqu'à 65% après le prétraitement des pommes par les CEP, à une intensité de 0,4 kV/cm (Grimi et al., 2011).

L'application des CEP comme technique non thermique d'amélioration des rendements en jus après pressage permet de préserver et même d'améliorer le contenu des jus en pigments, vitamines et autres molécules bioactives.

1.4.4.1.5. Moyens de détection de la perméabilisation membranaire

Plusieurs méthodes ont été testées pour la détection de la perméabilisation membranaire induite par les CEP.

La microscopie est une méthode conventionnelle qui permet l'évaluation de la perméabilisation. Elle est basée sur la rétention des colorants dans une cellule non traitée ayant une membrane cellulaire intacte, et la pénétration des colorants dans une cellule ayant une membrane perméabilisée (Fincan & Dejmek, 2002).

La deuxième méthode, fréquemment utilisée pour évaluer la rupture des cellules par les CEP est la mesure de la conductivité électrique dans le liquide extracellulaire. La formation des pores dans la membrane entraîne la libération des composés intracellulaires vers le liquide extracellulaire. La conductivité électrique du milieu va donc augmenter. Les mesures de conductivités électriques permettent de calculer l'indice de perméabilisation cellulaire (Z). La valeur de Z varie entre 0 et 1. Elle est égale à 0 pour le tissu intact et égale à 1 pour le tissu complètement endommagé (Lebovka, Bazhal, & Vorobiev, 2002).

L'application des CEP diminue la fermeté et la résistance mécanique du tissu. Cette diminution peut être évaluée par des analyses texturales (tests de compression, de relaxation...) (Fincan & Dejmek, 2003) et acoustiques (étude de la propagation du son dans le produit traité par les CEP) (Grimi et al., 2010).

1.4.4.2. Les décharges électriques de haute tension

1.4.4.2.1. Mécanisme d'action

Durant le traitement par les décharges électriques de haute tension (DEHT), un champ électrique intense est appliqué entre deux électrodes (pointe et plane) immergées dans l'eau. Un arc électrique est créé lorsqu'une tension suffisamment haute est appliquée. Si le champ appliqué atteint ou dépasse une valeur seuil, une avalanche électronique appelée « streamer » se propage d'une électrode à une autre. Le « streamer » correspond à des électrons accélérés provenant d'une première électrode qui ionisent et excitent les molécules d'eau en se propageant vers la deuxième électrode. Il en résulte alors un claquage électrique dans l'eau qui sera suivi d'une décharge. L'intervalle entre l'application de la haute tension et l'apparition de l'arc électrique (claquage) correspond à la phase de préclaquage. Cette phase contient donc les phénomènes liés à l'initiation du streamer et ceux liés à sa propagation. La durée de cette phase dépend de la tension. Plus la tension est basse et plus cette phase est longue. La phase de claquage électrique (arc électrique) commence au moment où le streamer relie les deux électrodes. A partir de ce moment, le courant électrique augmente et l'énergie dépensée dans l'arc augmente considérablement la température et la pression (Adda, 2018; Boussetta et al., 2013). La phase de claquage est accompagnée de nombreux phénomènes secondaires : une création des bulles de cavitation, une turbulence du liquide, une création des radiations UV, des ondes de choc et d'espèces chimiques actives (radicaux libres, peroxyde d'hydrogène). Ces phénomènes sont à l'origine de la fragmentation de

la matière première (Boussetta, Vorobiev, Le, Cordin-Falcimaigne, & Lanoisellé, 2012; Boussetta & Vorobiev, 2014). La figure 1-24 schématise le mécanisme d'action des DEHT.

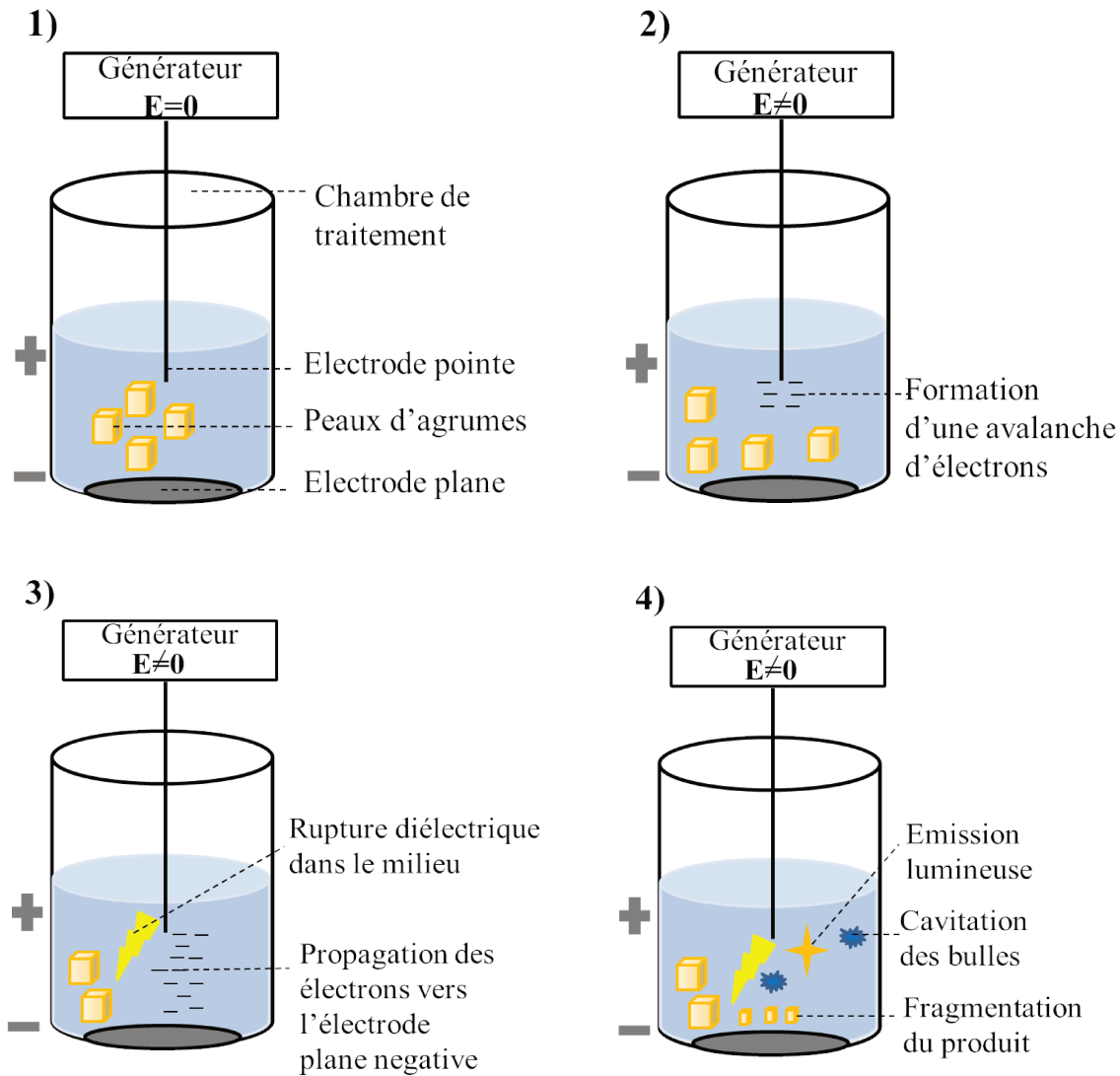


Figure 1-24. Schématisation des mécanismes d'action des décharges électriques de haute tension.

1.4.4.2.2. Equipement de traitement

La chambre de traitement des DEHT est sous forme de cylindres en téflon, fermés avec des parois de plusieurs centimètres d'épaisseur, pour supporter les différences de pression sur un temps court. Les électrodes de la chambre ont une géométrie pointe-plane différente de celle de la chambre des CEP (géométrie plane-plane). Cette géométrie facilite la génération des décharges électriques. La chambre est placée dans un générateur d'impulsions de haute tension. Une alimentation haute

tension va charger un condensateur de puissance. Quand le condensateur est chargé, un commutateur se ferme, et l'impulsion de haute tension est délivrée à la chambre de traitement (Adda, 2018).

1.4.4.2.3. Les principaux paramètres influençant le traitement par les DEHT

L'énergie du traitement

L'énergie du traitement par les DEHT influence les cinétiques d'extraction. Les DEHT ont été appliqués sur le marc de raisin pour une énergie allant de 0 à 800 kJ/kg. L'augmentation de l'énergie de 0 à 80 kJ/kg a significativement augmenté la concentration en polyphénols et l'activité antioxydante de l'extrait. Cependant, une énergie supérieure à 80 kJ/kg, a causé une diminution du contenu en polyphénols et de l'activité antioxydante de l'extrait (Figure 1-25). Ceci a été expliqué par la dégradation des polyphénols pour des longues durées de traitement par les DEHT (Boussetta & Vorobiev, 2014). L'effet négatif du nombre élevé des décharges a été attribué à la production d'espèces oxydantes comme les radicaux hydroxyles, l'hydrogène atomique et l'ozone. Ces espèces peuvent oxyder et endommager les polyphénols extraits (Rajha, Boussetta, Louka, Maroun, & Vorobiev, 2015).

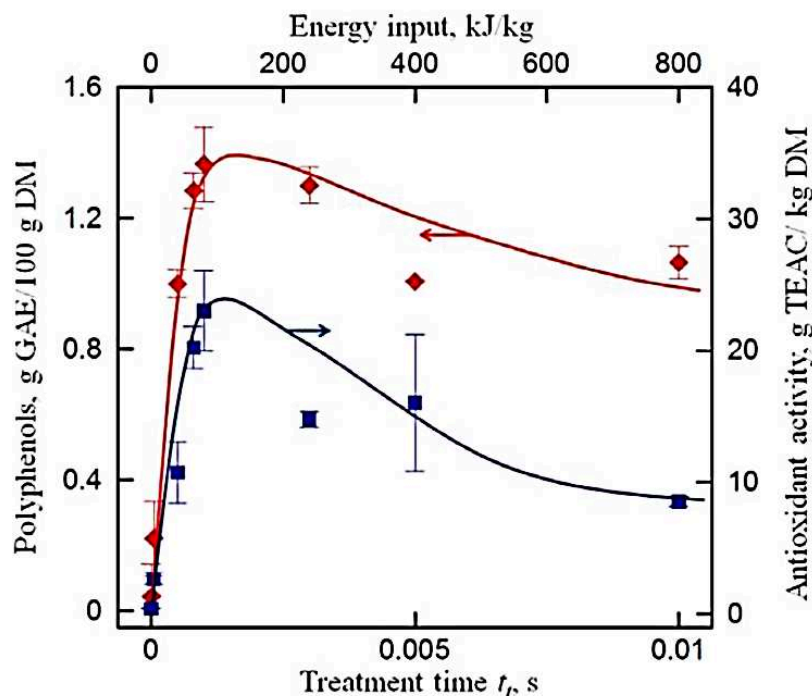


Figure 1-25. L'effet de l'énergie du traitement sur l'extraction des polyphénols à partir du marc de raisin (Boussetta & Vorobiev, 2014).

La distance entre les électrodes

La formation de la décharge dépend de la distance entre les électrodes pointe-plane. Il a été démontré que la distance inter-électrode optimale pour l'extraction des polyphénols à partir du marc de raisin est de 5 mm (Figure 1-26). A cette distance, la formation de l'arc s'effectue rapidement. Pour une distance plus élevée, l'intensité de la décharge diminue à cause du champ électrique qui s'affaiblit (Boussetta et al., 2011).

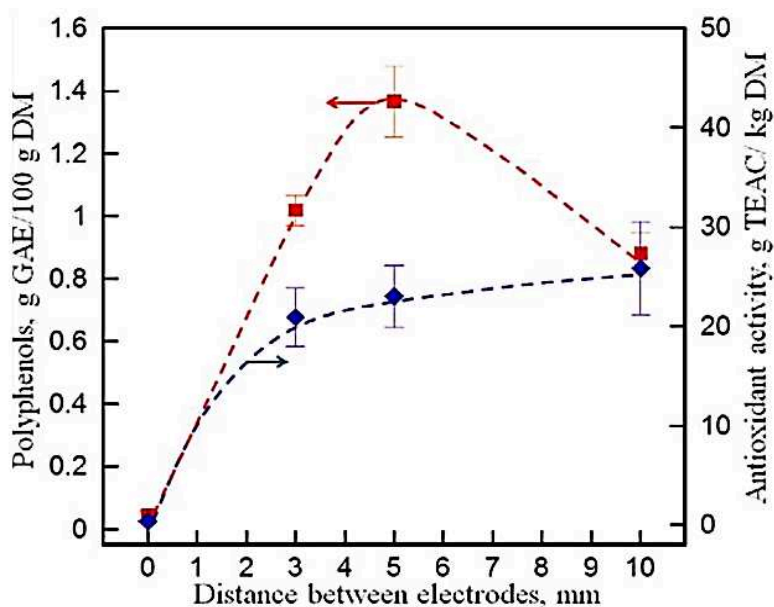


Figure 1-26. Effet de la distance entre les électrodes dans la chambre de traitement des DEHT sur les rendements et l'activité antioxydante des polyphénols extraits à partir du marc de raisin (Boussetta et al., 2011).

La température

L'augmentation de la température durant le traitement par les DEHT améliore l'extraction des solutés. La figure 1-27 montre les rendements en solutés extraits à partir du marc de raisin en fonction du temps de traitement, sans et avec DEHT, à des températures différentes. Les rendements ont augmenté quand la température durant le traitement a augmenté de 20°C à 60°C. L'augmentation de la température fragilise les membranes cellulaires et améliore la diffusion des molécules. A une température de 60°C, les rendements d'extraction ont été significativement différents sans DEHT (les lignes qui ne sont pas en gras) et avec DEHT (les lignes en gras). D'où l'effet des DEHT dans l'accélération de l'extraction. L'extraction avec les DEHT à une température de 20°C a donné les mêmes rendements en solutés que l'extraction sans DEHT à une

température de 40°C. L'application des DEHT, permet donc la diminution de la température durant le traitement et de la durée du traitement (Boussetta et al., 2009).

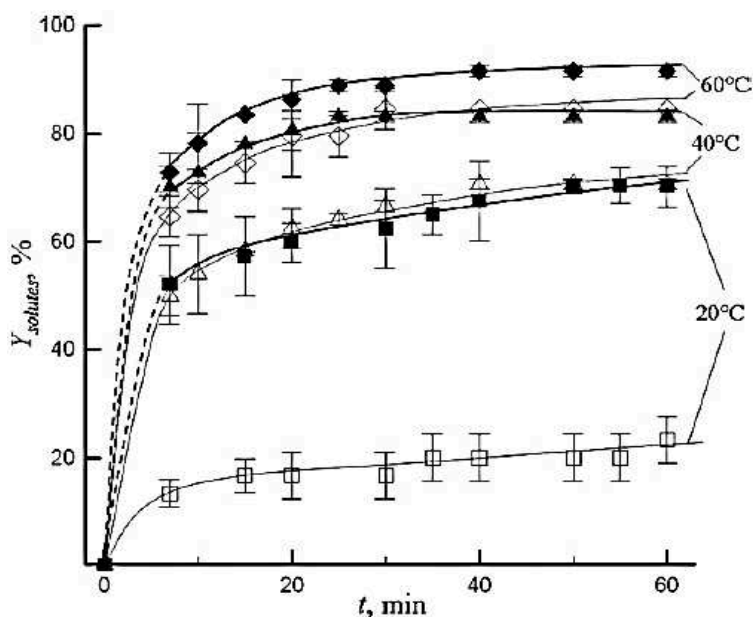


Figure 1-27. L'effet de la température sur l'extraction des solutés à partir du marc de raisin. Les lignes en pointillés suivies des lignes en gras correspondent aux traitements DEHT (distance entre les électrodes=5 mm ; U=40 kV ; n=80). Les lignes qui ne sont pas en gras correspondent aux témoins (sans DEHT) (Boussetta et al., 2009).

1.4.4.2.4. Applications

Les DEHT peuvent être utilisés dans diverses applications comme dans la décontamination de l'eau et l'inactivation des microorganismes. Récemment cette technologie a été utilisée pour l'extraction des molécules bioactives à partir de différentes matières premières. Les DEHT ont été efficaces pour l'extraction des polyphénols à partir des graines de lin (Boussetta et al., 2013), des peaux de papaye (Parniakov et al., 2014), des sarments de vigne (Rajha et al., 2014) et des pectines à partir des pulpes de betteraves à sucre (Almohammed et al., 2017). Durant le traitement par les DEHT, la propagation des ondes de choc et des bulles de cavitation permettent la fragmentation des particules, ce qui améliore les cinétiques d'extraction et les processus de transfert de masse (Boussetta & Vorobiev, 2014). À notre connaissance, aucune étude sur l'extraction assistée par les DEHT n'a été faite sur les agrumes et leurs coproduits.

1.4.4.3. Les ultrasons

1.4.4.3.1. Mécanisme d'action

Les ondes ultrasons (US) ont une fréquence élevée allant de 20 kHz à 1 MHz. Lors d'une extraction assistée par les ultrasons, l'échantillon est immergé dans le solvant et est soumis aux ultrasons à l'aide d'une sonde ou d'un bain à ultrason. Les ondes ultrasons se propagent dans un milieu liquide à proximité de la surface du produit, créant une succession de phases d'expansion (faible pression) et de compression (haute pression). Durant les cycles d'expansion, des bulles de cavitation sont créées dans le milieu (Chemat, Rombaut, Sicaire, et al., 2017). Ces bulles sont capables de croître au cours des phases d'expansion et de diminuer en taille au cours des phases de compression. Lorsque la taille de ces bulles atteint une valeur critique, elles implosent durant un cycle de compression (Figure 1-28). La création, le grossissement et l'implosion des bulles est connu sous le phénomène de « cavitation ». L'effondrement des bulles libère une grande quantité d'énergie ($T=500\text{ K}$, $P=200\text{ MPa}$). Les cellules et tissus à proximité, subissent des cisaillements répétitifs importants, ce qui augmente leur perméabilité, améliore la pénétration du solvant dans les cellules et par suite facilite l'extraction des molécules intracellulaires (Da Porto, Porretto, & Decorti, 2013; Yu, Gouyo, Grimi, Bals, & Vorobiev, 2016). La figure 1-29 schématise le mécanisme d'action des US.

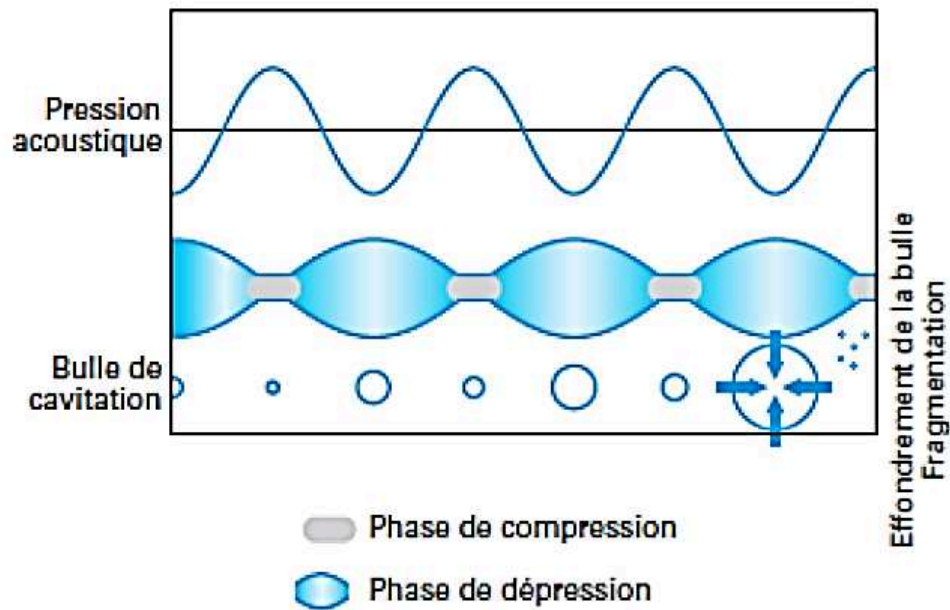


Figure 1-28. Schématisation de la croissance et de l'implosion d'une bulle de cavitation (Michel, 2011).

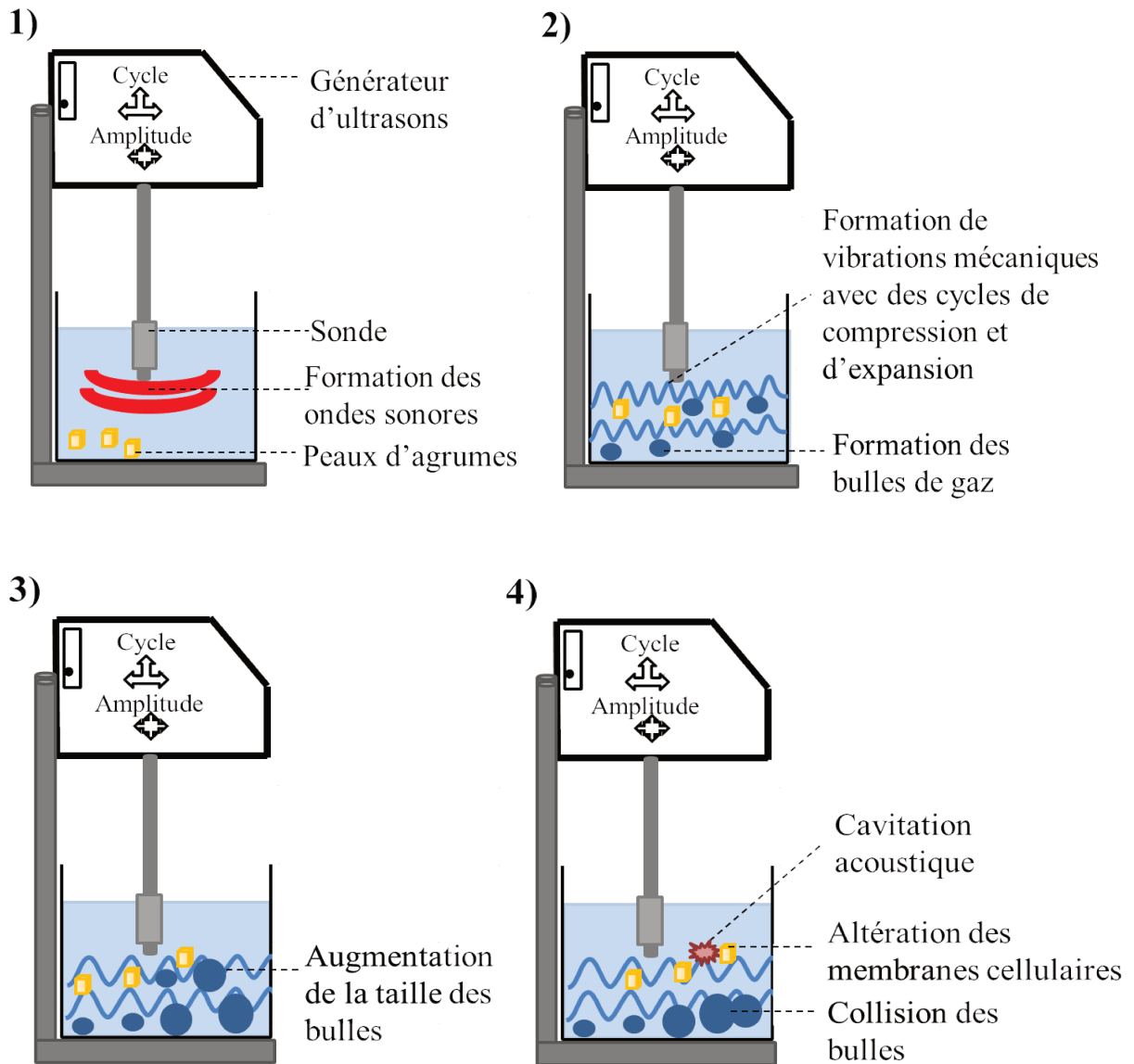


Figure 1-29. Schématisation des mécanismes d'action des ultrasons.

1.4.4.3.2. Equipement de traitement

Tous les systèmes à ultrasons sont composés d'un transducteur qui génère les ondes ultrasons. A l'échelle laboratoire, deux types de système sont généralement utilisés : les bains à ultrasons et le système de sonde. Les bains à ultrasons sont surtout utilisés pour des solutions de dégazage ou de nettoyage de petits matériaux par immersion. Ce système est peu efficace, car l'intensité délivrée est faible et atténuée par l'eau contenue dans le bain. Dans le système de sonde à ultrasons, l'intensité des ultrasons est délivrée par une petite surface qui est l'extrémité de la sonde. Dans ce

système, la cavitation est concentrée dans une petite zone en comparant avec le bain à ultrasons, d'où l'augmentation rapide de la température (Chemat, Rombaut, Meullemiestre, et al., 2017).

1.4.4.3.3. Les principaux paramètres influençant l'extraction avec les ultrasons

Plusieurs facteurs tels que la fréquence et la puissance du traitement, la température, la durée du traitement et le choix du solvant peuvent agir sur l'extraction avec les ultrasons. Ci-dessous les principaux paramètres qui influencent l'extraction avec les ultrasons.

La puissance et la fréquence des ultrasons

L'augmentation de la puissance des ultrasons augmente l'amplitude des ultrasons se déplaçant à travers le solvant, ce qui intensifie l'effondrement des bulles de cavitation. Par conséquent, les effets physiques générés comme l'endommagement des parois cellulaires, la dissipation de l'énergie locale et la diffusion du soluté seront améliorés. L'augmentation de la puissance des ultrasons de 130 à 250 W, a amélioré les rendements d'extraction de la curcumine de 5,99 mg/g à 9,18 mg/g à partir de la plante *Curcuma amada* (Figure 1-30a). Cependant des puissances très élevées des ultrasons, peuvent engendrer la dégradation des molécules d'intérêt. L'augmentation de la fréquence des ultrasons de 22 Hz à 40 Hz a diminué les rendements d'extraction de la curcumine (Figure 1-30b). À une fréquence élevée, une diminution de l'amplitude des effets physiques générés suite au phénomène de la cavitation peut s'observer. De plus, à des fréquences élevées, le temps nécessaire pour que les bulles atteignent une taille importante et accumulent de l'énergie est plus court, ce qui réduit l'intensité de la cavitation (Shirsath et al., 2017).

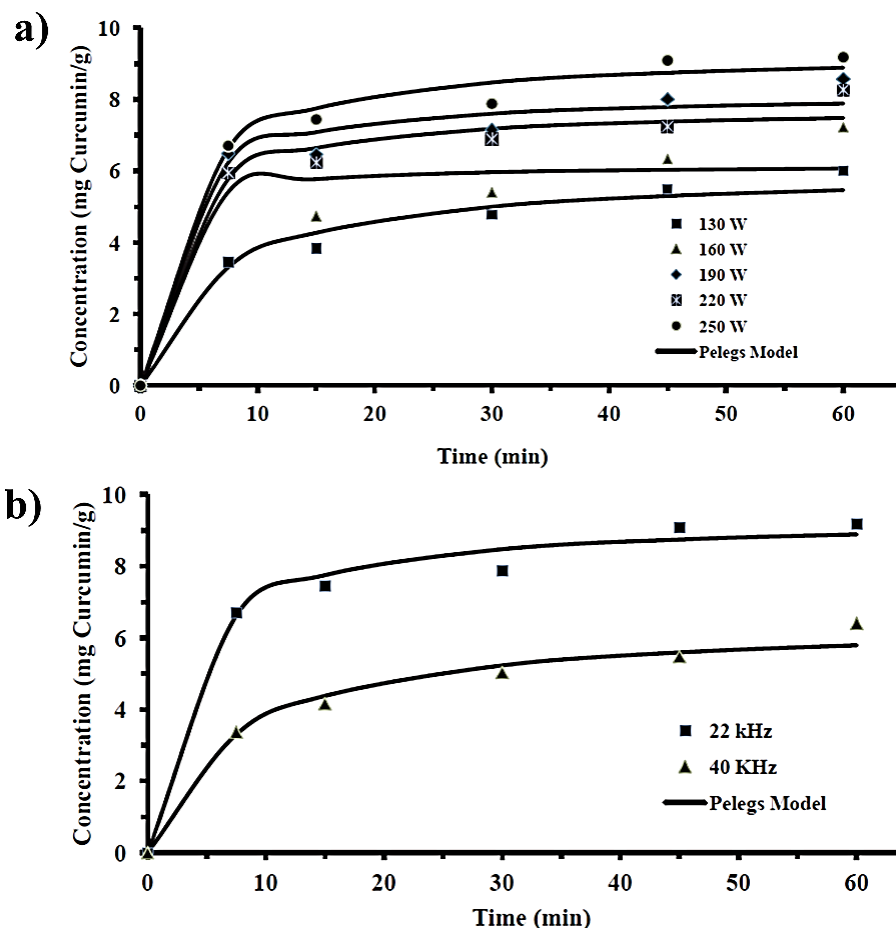


Figure 1-30. L'effet de la puissance des US (a) et de la fréquence des US (b) sur l'extraction de la curcumine à partir de la plante *Curcuma amada* (Shirsath et al., 2017).

La durée du traitement

La durée du traitement avec les ultrasons a une influence sur les rendements d'extraction. La figure 1-31 montre l'effet du prétraitement avec les ultrasons sur l'extraction des colorants à partir des fruits rouges. L'augmentation de la durée des ultrasons de 5 min jusqu'à 10 min a significativement amélioré l'extraction des colorants. Cependant il n'y a pas de différence significative entre 10 min et 15 min de traitement. Une durée de prétraitement de 10 min est donc suffisante pour l'extraction de la totalité des colorants (Koubaa, Barba, et al., 2016). Le facteur temps doit être aussi optimisé selon la nature des molécules d'intérêt à extraire. De longues durées de traitement peuvent dégrader les molécules d'intérêt, à cause de la génération des radicaux libres par les ondes ultrasons. Ce phénomène a été observé dans l'extraction des polyphénols à partir des plantes (Jovanović et al., 2017) et des raisins (Carrera, Ruiz-Rodríguez, Palma, & Barroso, 2012).

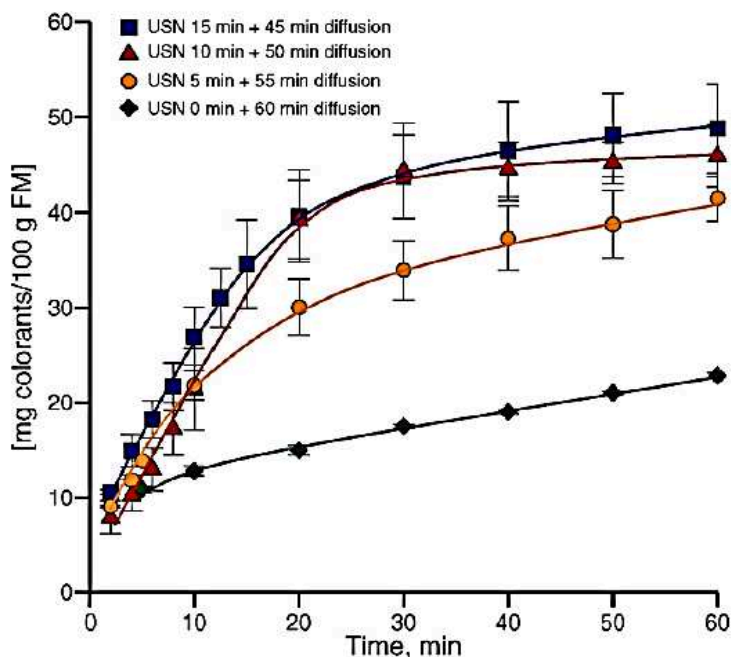


Figure 1-31. L'effet du temps de prétraitement avec les ultrasons sur l'extraction des colorants à partir des fruits rouges (Koubaa, Barba, et al., 2016).

La température

Les températures élevées diminuent la viscosité du solvant et la tension de surface. L'augmentation de la température de 30°C à 70°C durant le traitement avec les ultrasons, a amélioré l'extraction des polyphénols de 40%, à partir des sous-produits de la chicorée (Pradal, Vauchel, Decossin, Dhulster, & Dimitrov, 2016). Ceci peut être expliqué par l'augmentation du nombre des bulles de cavitation à des températures élevées, ce qui améliore le contact solide-solvant. Cependant, l'augmentation de la température induit aussi une augmentation de la pression de vapeur. Ceci permet à la vapeur du solvant de pénétrer dans les bulles formées, réduisant ainsi la différence de pression entre l'intérieur et l'extérieur des bulles. Les bulles vont donc s'effondrer moins violemment et les effets de sonication seront réduits. Par conséquent, l'utilisation de températures supérieures à un certain seuil peuvent réduire les effets des ultrasons et diminuer l'efficacité de l'extraction (Palma & Barroso, 2002; Sousa, 2015). Plusieurs auteurs ont constaté que le traitement avec les ultrasons est plus efficace à des faibles températures (Chemat, Rombaut, Sicaire, et al., 2017). Il est donc important d'optimiser le facteur température pour obtenir des rendements d'extraction maximaux sans la dégradation des molécules d'intérêt.

Le choix du solvant

Le solvant d'extraction doit être choisi selon la nature et la solubilité des molécules d'intérêt. Cependant, d'autres paramètres physiques tels que la viscosité et la tension superficielle influencent aussi sur le choix du solvant. Pour que les bulles de cavitation soient efficaces, la pression négative pendant le cycle d'expansion doit surmonter les forces de cohésion naturelles dans le milieu. Une tension superficielle élevée diminue les phénomènes de cavitation. La pression de vapeur est également directement liée avec le facteur de température, qui a aussi une influence sur la cavitation. Par conséquent, le solvant doit avoir une très faible pression de vapeur et doit être capable de solubiliser les molécules d'intérêts (Sousa, 2015).

1.4.4.3.4. Applications

Les ultrasons ont été appliqués dans l'industrie alimentaire dans de nombreux processus comme la congélation (Li & Sun, 2002), le séchage (Fuente-blanco & Sarabia, 2006), le blanchiment (Su et al., 2013) et la stérilisation (Chandrapala, Oliver, Kentish, & Ashokkumar, 2012).

Les ultrasons sont fréquemment utilisés dans les procédés d'extraction. Ils ont amélioré l'extraction des polysaccharides à partir des sous-produits de champignons (Aguiló-Aguayo, Walton, Viñas, & Tiwari, 2017) ; des polyphénols à partir des baies d'aronia (D'Alessandro, Kriaa, Nikov, & Dimitrov, 2012), des chicorées (Pradal, Vauchel, Decossin, Dhulster, & Dimitrov, 2016; Vauchel et al., 2018), des pépins de raisins (Da Porto et al., 2013), du marc de raisin (Bonfigli, Godoy, Reinheimer, & Scenna, 2017), et des raisins (Carrera et al., 2012) ; des huiles à partir des graines oléagineuses (Koubaa, Mhemdi, et al., 2016); des protéines à partir du colza (Yu, Gouyo, Grimi, Bals, & Vorobiev, 2016) et des sarments de vigne (Rajha et al., 2014).

Les ultrasons ont été aussi utilisés pour l'extraction des molécules bioactives à partir des coproduits d'agrumes. Ils ont augmenté l'extraction des polyphénols à partir des peaux d'oranges de 19 à 21 g/kg de peaux par rapport à l'extraction solide-liquide conventionnelle à une puissance de 125 W. L'augmentation de la puissance des ultrasons de 125 W à 200 W a amélioré l'extraction des polyphénols (M'hiri, Ioannou, Mihoubi Boudhrioua, & Ghoul, 2015). La concentration en polyphénols obtenue après 15 min de traitement des peaux d'oranges avec les ultrasons (40°C, 150 W, 80% éthanol-eau) a été significativement plus élevée que celle obtenue avec l'extraction solide-liquide (mêmes conditions mais sans sonication) (Khan, Abert-Vian, Fabiano-Tixier, Dangles, & Chemat, 2010). L'extraction des polyphénols assistée par les ultrasons à partir des peaux

d'oranges, de citrons verts et de mandarines a donné respectivement des rendements en flavonoïdes égaux à 75, 66 et 58 mg GAE/g de peaux (Londoño-Londoño et al., 2010)

Les principaux avantages de l'extraction par les ultrasons par rapport à l'extraction solide-liquide conventionnelle sont la réduction de la durée du traitement et du volume du solvant utilisé, l'obtention des rendements élevés en molécules cibles et la diminution de la consommation d'énergie (Bonfigli et al., 2017).

1.4.4.4. Les infrarouges

Les rayons infrarouges sont des rayonnements électromagnétiques situés entre le domaine du visible (0,38-0,78 μm) et le domaine des microondes (1-1000 mm). Le domaine des infrarouges est divisé en trois régions : l'infrarouge proche (0,78-1,4 μm), moyen (1,4-3 μm) et lointain (3-1000 μm) (Figure 1-32). Généralement, l'infrarouge lointain, constitué de plusieurs longueurs d'ondes est utilisé comme source de chauffage, surtout dans le domaine alimentaire, vu que les composants majeurs des produits alimentaires absorbent à une longueur d'onde supérieure à 2,5 μm . Les rayons infrarouges qui arrivent à la surface d'un produit peuvent vibrer les molécules et les atomes dans différents modes d'étirement, de rotation, de basculement et de torsion, ce qui induit le chauffage. Durant le chauffage par les infrarouges, la surface du produit est chauffée rapidement par le rayonnement infrarouge et la chaleur est ensuite transférée à l'intérieur du produit par conduction. La profondeur de pénétration des rayons infrarouges dans un produit est estimée à 2 mm. Cependant, la longueur de pénétration s'élève dans les produits poreux et ayant une teneur en eau élevée. L'efficacité du chauffage infrarouge dépend de l'adéquation entre la longueur d'onde du rayonnement et les caractéristiques du solvant ou du produit chauffé. Le tableau 1-7 montre la longueur d'onde d'absorption de certains groupements chimiques. Dans certains cas, quand le spectre d'émission infrarouge n'est pas compatible avec les longueurs d'ondes les mieux absorbées par le produit, une croûte est créée à la surface du produit chauffé et empêche le transfert de la chaleur à l'intérieur du produit. L'efficacité du chauffage infrarouge dépend des caractéristiques d'absorption du produit chauffé (Krishnamurthy et al., 2008; Rastogi, 2012).

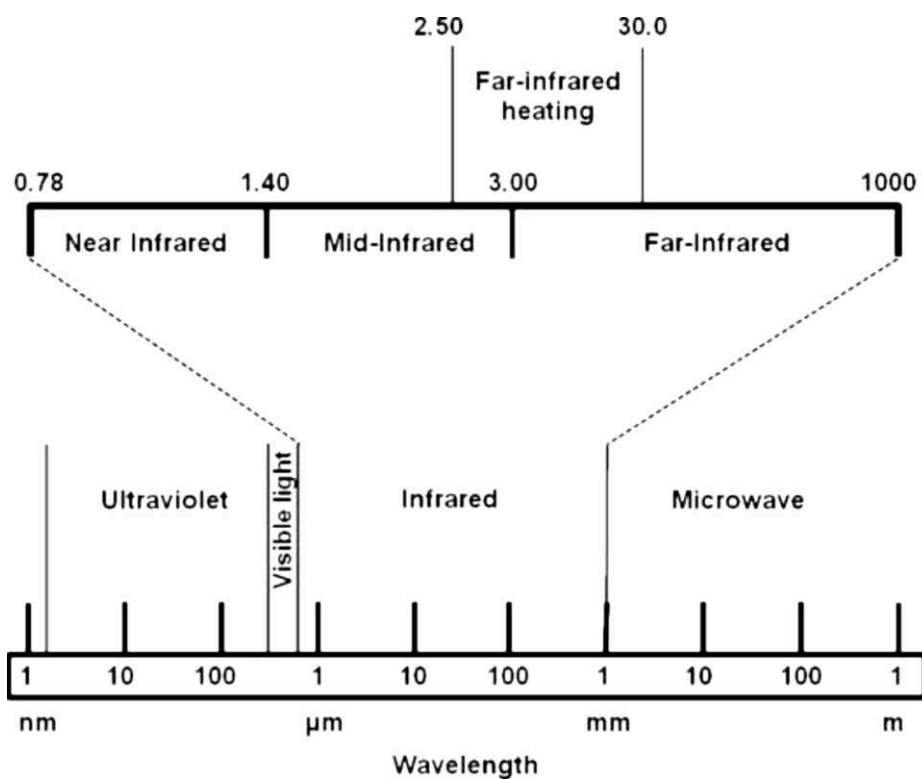


Figure 1-32. Le spectre d'ondes électromagnétiques (Rastogi, 2012).

Tableau 1-7. Les longueurs d'onde d'absorption (μm) de certains groupements chimiques dans le domaine des infrarouges (Krishnamurthy et al., 2008).

Groupement chimique	Longueur d'onde d'absorption (μm)
Groupement hydroxyle (O-H)	2,7-3,3
Liaison aliphatique carbone-hydrogène	3,25-3,7
Groupement carbonyle (C=O) (ester)	5,71-5,76
Groupement carbonyle (C=O) (amide)	5,92
Groupement azote-hydrogène (-NH-)	2,83-3,33
Liaison carbone-carbone (C=C)	4,44-4,76

Les rayons infrarouges sont caractérisés par le chauffage direct du solvant sans chauffer l'air environnant. Ceci est par opposition au chauffage conventionnel, durant lequel une certaine période est nécessaire pour chauffer le récipient avant que la chaleur ne soit transférée à la solution. Par exemple, durant le chauffage infrarouge, le solvant (méthanol-eau) a atteint sa température d'ébullition en 7 min, alors que dans le chauffage électrique classique la température augmente plus lentement et le point d'ébullition est atteint après 13 min (Cai, Yu, Duan, & Li, 2011). Les

principaux avantages du chauffage infrarouge sont la courte durée d'extraction et les températures d'extraction relativement faibles ainsi que les faibles consommations énergétiques.

1.4.4.4.1. Applications

Les rayons infrarouges sont surtout utilisés dans le chauffage domestique et industriel et dans le domaine médical (Chen, Liu, & Chen, 2011). Le chauffage infrarouge est utilisé pour le séchage, la cuisson, la pasteurisation et l'inactivation des microorganismes. Il a été aussi utilisé pour l'extraction des polysaccharides à partir des plantes (Qu, Li, Zhang, Zeng, & Fu, 2016) et des polyphénols à partir des pépins de raisins (Cai et al., 2011), des coproduits d'abricots (Cheaib et al., 2018) et des feuilles de plantes (Duan, Chen, & Chen, 2010). En utilisant l'extraction solide-liquide conventionnelle, les rendements d'extraction de la catéchine, l'épicatéchine et la procyanidine B2 des pépins de raisins étaient de 30, 25 et 7 mg/g, respectivement. Tandis qu'en utilisant le chauffage infrarouge, les rendements d'extraction de la catéchine, l'épicatéchine et la procyanidine B2 s'élèvent jusqu'à 47, 30 et 12 mg/g (Cai, Yu, Duan, & Li, 2011). L'efficacité de l'extraction est expliquée par la longueur d'onde du rayonnement infrarouge. Elle correspond aux caractéristiques d'absorption du solvant d'extraction et des molécules bioactives à la fois. Le chauffage infrarouge induit un éclatement des cellules, ce qui favorise la libération des molécules bioactives. À notre connaissance, l'extraction assistée par les infrarouges n'a pas été appliquée auparavant sur les agrumes et leurs coproduits.

1.4.4.5. Les microondes

1.4.4.5.1. Mécanisme d'action

Les microondes (MO) sont des ondes électromagnétiques avec une gamme de fréquence allant de 300 GHz à 300 MHz, ce qui correspond à une longueur d'onde allant de 1 mm à 1 m. Contrairement à un chauffage classique, durant le chauffage par les MO, c'est le produit traité qui est la source de la chaleur, et le dégagement de chaleur s'effectue de l'intérieur vers l'extérieur (Figure 1-33). La matière est donc chauffée de manière directe. Cela est rendu possible par la rotation dipolaire (Bousbia, 2011). Les MO comprennent des composants de champs électriques et magnétiques propageant l'énergie électromagnétique. Cette énergie agit comme un rayonnement non ionisant et provoque des mouvements moléculaires des ions et la rotation des dipôles. Quand les matériaux diélectriques contenant des dipôles permanents ou induits sont placés dans un champ MO, la rotation des dipôles dans le champ alternatif produit de la chaleur. Ce phénomène est expliqué

dans la figure 1-34. En absence de champ électrique, les molécules constituées d'un dipôle diélectrique sont orientées aléatoirement. Ces molécules s'orientent dans la direction du champ électrique, quand ce dernier est appliqué d'une façon continue. Sous l'effet d'un champ électrique alternatif de haute fréquence, les molécules dipolaires s'orientent dans la direction du champ, se désorientent lorsque le champ s'annule puis se réorientent dans l'autre sens du champ. Les mouvements de réalignement vont être perturbés par les liaisons qui existent entre les molécules (liaisons hydrogènes, liaisons de Van der Waals). Ce qui induit des frictions entre les molécules et par conséquent une libération d'énergie thermique (Chemat, Fabiano-Tixier, Vian, Allaf, & Vorobiev, 2015). L'efficacité du chauffage d'un matériau avec les MO dépend de ses propriétés diélectriques. La profondeur de pénétration des ondes D_p (m) est définie dans la formule suivante :

$$D_p = \frac{\lambda \sqrt{\epsilon'}}{2\pi\epsilon''} \quad (1.3)$$

où λ la longueur d'onde (m), ϵ' est la constante diélectrique du matériau ou sa capacité à s'orienter sous l'action du champ électrique et ϵ'' est le facteur de perte diélectrique ou le coefficient d'absorption du matériau.

Un matériau ayant une profondeur de pénétration élevée est donc un matériau sensible aux MO. Par exemple, à 25°C et pour une fréquence de 2450 MHz, la profondeur de pénétration est de 1,4 cm pour l'eau et de 1,3 cm pour l'éthylène glycol (Zill-e-huma, 2010).

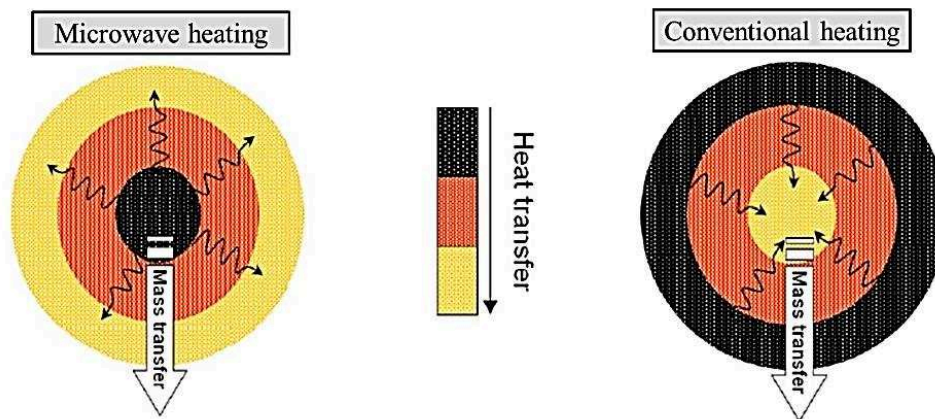


Figure 1-33. Le transfert de la chaleur durant un chauffage classique et durant le chauffage par les microondes (Zill-e-huma, 2010).

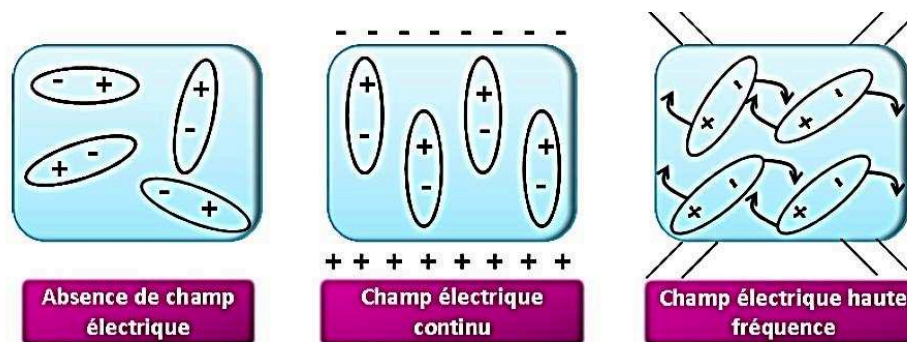


Figure 1-34. Représentation schématique du comportement de molécules possédant un dipôle en absence de champ électrique, sous l'effet d'un champ électrique continu et sous l'effet d'un champ électrique de haute fréquence (Michel, 2011).

1.4.4.5.2. Equipement de traitement

L'échantillon est placé dans un réacteur relié à un générateur de microondes. Le générateur génère les microondes à partir de l'énergie électrique. Un système de contrôle de température permet de fixer la température. La température à l'intérieur de l'échantillon est détectée grâce à une sonde infrarouge.

1.4.4.5.3. Les principaux paramètres influençant l'extraction par les microondes

L'extraction assistée par les microondes consiste à chauffer un produit, sec ou humide, en contact avec un solvant partiellement ou totalement transparent. Cette technique permet d'accélérer la cinétique d'extraction et de réduire le ratio solvant/charge. Plusieurs paramètres peuvent influencer l'extraction par les microondes.

Le choix du solvant

Durant le chauffage par les microondes, le solvant est choisi selon la nature des molécules d'intérêt à extraire et selon sa capacité à absorber les microondes (selon son facteur de pertes ou coefficient d'absorption de l'onde ϵ''). Les solvants qui possèdent un facteur de pertes supérieur à 1 tels que l'eau et les solvants polaires comme les alcools absorbent fortement les MO. Les solvants peu polaires ayant un facteur de pertes compris entre 0,1 et 1 comme l'acétate d'éthylène ne s'échauffent pas bien sous MO.

La puissance

La puissance des microondes a un effet sur les rendements d'extraction. La figure 1-35 montre l'effet de la puissance des MO sur l'extraction des polyphénols à partir des peaux d'oranges. L'augmentation de la puissance des microondes de 100 à 200 W a entraîné une augmentation de la

concentration en polyphénols de $23,40 \pm 0,12$ à $26,88 \pm 0,78$ g GAE/kg de poudre de peaux d'oranges. Cependant, pour une puissance supérieure à 200 W, la concentration en polyphénols diminue jusqu'à $23,81 \pm 0,41$ g GAE/kg de poudre d'oranges à 400 W. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait qu'une puissance élevée des microondes induit une augmentation de la température qui peut dégrader les molécules thermolabiles (M'hiri et al., 2015).

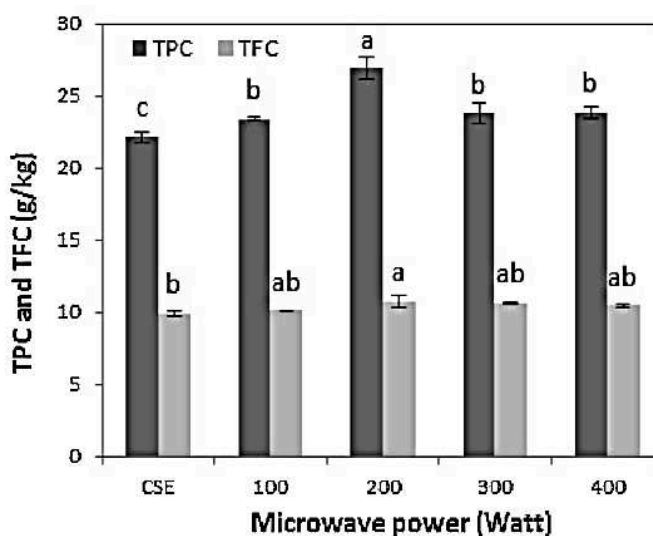


Figure 1-35. Les concentration en polyphénols totaux et en flavonoïdes extraits à partir des peaux d'oranges en fonction de la puissance des MO (M'hiri et al., 2015).

1.4.4.5.4. Applications

Les ondes microondes sont utilisées pour le chauffage, la décongélation et la cuisson des aliments (Chandrasekaran, Ramanathan, & Basak, 2013).

Les microondes ont été appliquées sur les agrumes et leurs coproduits. Elles ont été utilisées pour l'extraction des pectines à partir des peaux d'oranges (Guo et al., 2012; Kratchanova, Pavlova, & Panchev, 2004; Maran, Sivakumar, Thirugnanasambandham, & Sridhar, 2013). Il a été démontré que les microondes désactivent l'enzyme pectinestérase qui se trouve dans les peaux d'oranges, ce qui améliore l'extraction de la pectine durant le chauffage (Kratchanova et al., 2004).

Les polyphénols ont été extraits à partir des peaux d'oranges par les microondes, en utilisant l'éthanol comme solvant. L'utilisation des microondes à une puissance de 200 W a permis d'extraire 26,88 g GAE/kg de peaux à une température de 60°C. A la même température, l'extraction solide-liquide conventionnelle a permis d'extraire 22,13 g GAE kg de peaux. D'où l'effet des microondes dans l'augmentation de la rupture des cellules et de leur porosité, ce qui a

permis d'améliorer l'extraction des polyphénols (M'hiri, Ioannou, Mihoubi Boudhrioua, & Ghoul, 2015).

1.4.4.5.6. Méthodes dérivées de l'extraction assistée par les microondes

1.4.4.5.6.1. L'extraction sans solvant assistée par microondes

Cette méthode consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur microondes sans ajout d'eau ou de solvant organique (Figure 1-36). Elle a été développée et utilisée pour l'extraction des huiles essentielles à partir de la matière végétale. Le chauffage de l'eau contenue dans la plante permet la rupture des glandes contenant l'huile essentielle. Cette étape libère l'huile essentielle, qui est entraînée par la vapeur d'eau dégagée de la matière végétale. Un système de refroidissement à l'extérieur du four microondes permet la condensation de façon continue du distillat, composé d'eau et d'huiles essentielles, et le retour de l'excès d'eau à l'intérieur du ballon afin de maintenir le taux d'humidité propre au matériel végétal (Aissou et al., 2017; Chemat, Rombaut, Meullemiestre, et al., 2017).

Ce système a été utilisé pour extraire les huiles essentielles à partir des peaux d'oranges. Un rendement en huiles de 0,42% a été obtenu en utilisant ce système en 30 min seulement, sans l'ajout d'aucun solvant. Alors que avec l'hydrodistillation classique 0,39% d'huiles ont été extraites en 3 heures, en utilisant des grandes quantités d'eau (Ferhat, Meklati, Smadja, & Chemat, 2006). Dans une autre étude, une comparaison de point de vue consommation d'énergie a été faite entre l'hydrodistillation et l'extraction sans solvant assistée par les MO. Les rendements en huiles obtenus avec l'hydrodistillation et les MO étaient de 1,7% et 1,85% respectivement. La consommation d'énergie a diminué de 3,2 kWh avec l'hydrodistillation jusqu'à 0,5 kWh avec les MO (Bustamante et al., 2016). L'utilisation des MO comme technologie alternative pour l'extraction des huiles essentielles diminue donc la consommation de solvant, la durée d'extraction et la consommation d'énergie.

1.4.4.5.6.2. Hydrodiffusion assistée par microondes et gravité

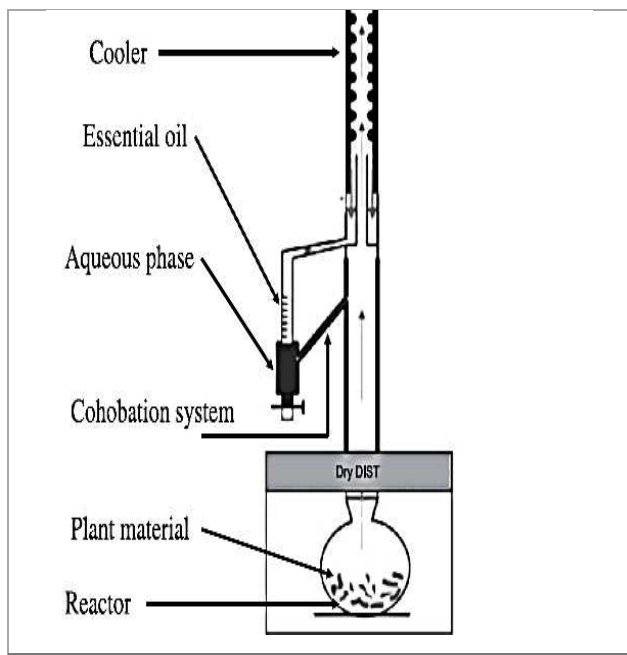
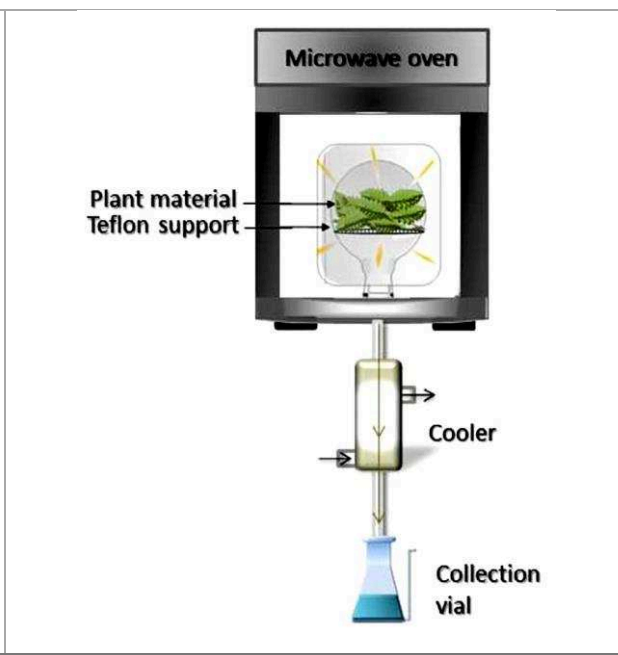
Cette technique consiste à combiner les microondes avec la gravité terrestre, à pression atmosphérique (Figure 1-37). Comme dans la distillation assistée par les microondes, le matériel végétal est directement placé dans un réacteur à microondes sans l'ajout d'aucun solvant. Le chauffage de l'eau interne du matériel végétal conduit à la rupture des glandes et des cellules végétales. Le chauffage par les microondes libère ainsi des molécules d'intérêt avec l'eau interne. Ce phénomène physique, connu sous le nom d'hydrodiffusion, permet de diffuser les molécules

d'intérêt à l'extérieur du matériel végétal. Sous l'effet de la gravité de la terre, les molécules extraites passent du réacteur à microondes à travers un disque en pyrex. Un échangeur de chaleur à l'extérieur du four à microondes refroidit l'extrait (Chemat, Fabiano-Tixier, Vian, Allaf, & Vorobiev, 2015).

Ce système a été développé pour l'extraction des huiles essentielles. La combinaison des microondes avec la gravité terrestre a permis d'extraire les huiles essentielles à partir des peaux de citrons verts en 15 min seulement, en comparant avec l'hydrodistillation conventionnelle qui nécessite 3 heures (Bousbia, Vian, Ferhat, Meklati, & Chemat, 2009). Un rendement en huiles de 4% a été obtenu en traitant les peaux d'oranges avec ce système à une puissance de 500 W et pour une durée de 10 min seulement (Boukroufa, Boutekedjiret, Petigny, Rakotomanomana, & Chemat, 2015).

L'hydrodiffusion assistée par microondes et gravité a été utilisée pour l'extraction des flavonoïdes à partir des onions (Zill-e-Huma, Abert Vian, Maingonnat, & Chemat, 2009).

Récemment ce système a été aussi utilisé comme un moyen alternatif au pressage pour l'extraction d'un jus enrichi en polyphénols à partir des prunes (Cendres et al., 2012), des fraises (Turk et al., 2017) et des raisins (Bittar, Perino-Issartier, Dangles, & Chemat, 2013).

	
<p>Figure 1-36. Schéma du réacteur dans l'extraction sans solvant assistée par les microondes (Ferhat et al., 2007).</p>	<p>Figure 1-37. Schéma du réacteur dans l'hydrodiffusion assistée par microondes et gravité (Chemat, Fabiano-Tixier, Vian, Allaf, & Vorobiev, 2015).</p>

1.5. Conclusions et positionnement du sujet

Dans ce chapitre, nous avons décrit la famille des agrumes qui contient un très grand nombre d'espèces dont les fruits sont largement appréciés par les consommateurs. Le pressage des agrumes produit des déchets qui, dans la plupart des cas, sont abandonnés sur le sol ou dédiés à l'alimentation animale. Ces déchets représentent 50% de la masse des fruits pressés. Le manque des méthodes de gestion des déchets et leur accumulation cause des problèmes économiques et environnementaux importants. Les principaux déchets qui résultent du pressage des agrumes sont les peaux (flavédo et albédo), les pépins et les pulpes. Ces déchets se caractérisent par leur contenu en molécules naturelles à haute valeur ajoutée : flavonoïdes, pigments, vitamines, huiles essentielles et sucres. De nos jours, on s'intéresse beaucoup à l'obtention d'antioxydants et de molécules d'origine naturelle qui peuvent être utilisés dans les produits alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques. D'où l'intérêt de la valorisation des déchets par l'extraction de ces molécules.

Dans nos travaux de recherche, on s'est intéressé à la valorisation des peaux d'agrumes vu qu'elles représentent 60 à 65% de la masse totale des déchets. Les peaux contiennent surtout les glandes à huiles essentielles, les pigments, les pectines et les flavonoïdes. Nous avons décrit les méthodes d'extraction conventionnelles et innovantes qui ont été utilisées pour l'extraction de ces composés à partir des coproduits d'agrumes.

Parmi les méthodes conventionnelles, l'extraction solide-liquide est la méthode d'extraction la plus classique qui est généralement utilisée. Cependant elle présente plusieurs inconvénients, surtout quant à l'utilisation des solvants organiques toxiques. Il est donc important de trouver des solvants alternatifs verts qui peuvent être utilisés. À notre connaissance, parmi les extractions solide-liquides proposées, aucune n'a porté sur l'extraction des composés phénoliques avec le glycérol ou les solvants eutectiques profonds. Nous avons donc proposé de nouveaux solvants verts adaptés à l'extraction des flavonoïdes présents dans les peaux d'agrumes. Ces solvants sont peu coûteux, inoffensifs et peuvent ne pas être éliminés de l'extrait obtenu.

Dans la majorité des cas, un prétraitement de la matière première (traitement thermique, broyage) est nécessaire pour augmenter la perméabilité des membranes cellulaires, durant l'extraction solide-liquide. Les prétraitements nécessitent des consommations énergétiques importantes et

peuvent causer des problèmes au niveau de la qualité de l'extrait. Pour cette raison, nous avons proposé de prétraiter les peaux d'agrumes par des technologies innovantes telles que les CEP, les DEHT et les IR. Ces prétraitements ont pour objectif d'améliorer les cinétiques et les rendements d'extraction, durant l'extraction solide-liquide conventionnelle. A notre connaissance, les DEHT et les IR n'ont pas été appliqués sur les peaux d'agrumes.

Cependant, il est aussi primordial de proposer des alternatives à l'extraction solide-liquide, qui pourraient améliorer les rendements d'extraction tout en réduisant les coûts énergétiques des procédés. L'utilisation des technologies innovantes dans nos travaux de recherche (CEP, DEHT, US, MO et IR) ont visé à :

- 1) Proposer un moyen d'augmenter les rendements en jus d'agrumes après le pressage, et d'enrichir le jus obtenu en composés phénoliques : prétraitement des agrumes entiers avec les CEP avant leur pressage.
- 2) Caractériser l'endommagement induit par les CEP sur les agrumes entiers par différentes méthodes (acoustique, texturométrie, microscopie électronique).
- 3) Identifier les concentrations et la nature des composés phénoliques présents séparément dans le flavédo et l'albédo des peaux d'agrumes avant et après CEP. L'objectif étant de :
 - Déterminer sur quelle partie spécifique de la peau des agrumes agissent les CEP.
 - Déterminer l'effet de l'organisation de la structure du fruit, sa taille, la distribution des cellules et l'épaisseur de la paroi cellulaire des différents agrumes sur l'efficacité des CEP.
- 4) Proposer une bioraffinerie qui consiste à extraire les molécules bioactives présentes dans les peaux d'agrumes, séparément et en plusieurs étapes.
- 5) Se familiariser avec le principe de l'extraction verte en utilisant des technologies sans l'ajout d'aucun solvant : l'extraction des huiles essentielles sans solvant assistée par les microondes ; le ramollissement des membranes cellulaires avec le chauffage infrarouge sans solvant.
- 6) Intensifier les cinétiques et les rendements d'extraction par le couplage d'un traitement électrique (les DEHT) avec un traitement biologiques (l'extraction assistée par les enzymes).
- 7) Optimiser les différents paramètres d'extraction.

Durant cette thèse, nous avons suivi une démarche de valorisation complète : de la réception des fruits entiers et de leur pressage, jusqu'à l'obtention des déchets et leur valorisation par des technologies innovantes.

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

Ce chapitre présente les matériels et méthodes adoptés au cours du travail. Tout d'abord, les agrumes entiers sont traités par les champs électriques pulsés, pour améliorer les rendements en jus et son contenu en composés phénoliques après pressage. Ensuite, parmi les déchets résultant du pressage des agrumes, les peaux sont valorisées. Ce chapitre présentera les différentes méthodes de valorisation conventionnelles et innovantes qui ont été utilisées (Figure 2-1), ainsi que les dispositifs expérimentaux et les analyses physico-chimiques.

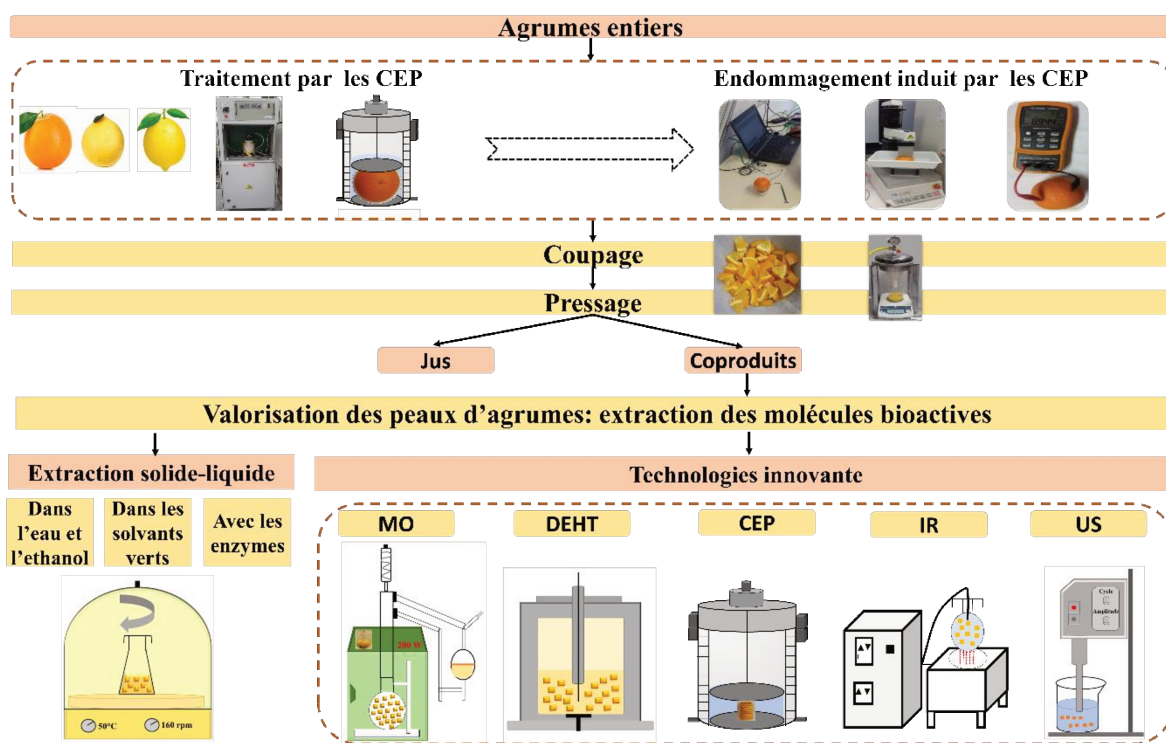


Figure 2-1. Stratégie expérimentale globale.

2.1. Matières premières

2.1.1. Agrumes

Les agrumes (oranges, pommelos et citrons de la même variété) sont achetés d'un supermarché local à Compiègne, France. Les fruits de bonne qualité et approximativement de la même taille sont sélectionnés et stockés à 4°C jusqu'à leur utilisation. Les teneurs en humidité sont mesurées en

séchant 25 g des tissus de fruits frais à l'étuve à 105°C, jusqu'à la stabilisation de la masse. Elles sont d'environ 87% pour l'orange, 90% pour le pomelo et 92% pour le citron.

2.1.2. Peaux d'agrumes

Les peaux d'agrumes (oranges, pamplemousses et citrons) sont fournies par une société libanaise « Balkis ». Les peaux sont conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation. Les teneurs en matière sèche sont mesurées en séchant les peaux à l'étuve à 105°C, jusqu'à la stabilisation de la masse. Le pourcentage de matière sèche MS des peaux d'agrumes est compris entre 24% et 46%. Il est calculé comme suit :

$$MS = (m_f / m_i) * 100 \quad (2.1)$$

où m_i (g) est la masse initiale des peaux (avant séchage) et m_f (g) est leur masse après séchage.

Selon les expérimentations, les peaux sont soit utilisées fraîches soit séchées. Pour les peaux fraîches, elles sont coupées en des carrés de 1 cm² (Figure 2-2) et stockées à 4°C jusqu'à leur utilisation.



Figure 2-2. Peaux d'agrumes de 1 cm² de surface.

Pour les peaux sèches, le protocole suivant est utilisé. Le séchage est effectué à 50°C, dans une étuve, jusqu'à la stabilisation de la masse (après 40 h). Les peaux sèches sont ensuite broyées dans un moulin à café, à une puissance de 150 W, jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. L'énergie W_{br} du broyage est calculée comme suit :

$$W_{br} = (P \cdot t) / m \quad (2.2)$$

où t est la durée totale du broyage (s), m est la masse du produit (kg) et P est la puissance du moulin à café (W).

2.2. Les procédés d'intensification de l'extraction

2.2.1. Les microondes

L'extraction des huiles essentielles est réalisée avec les microondes (MO) sans solvant. Des peaux d'oranges fraîches (200 g) sont placées dans un ballon dans le four MO (Figure 2-3). La puissance maximale des MO, délivrée par le générateur est de 900 W. Les huiles essentielles s'entraînent avec la vapeur d'eau qui se dégage des peaux d'oranges et se condensent à l'aide d'un réfrigérant. L'huile est ensuite séparée de l'eau par décantation. La puissance des microondes est fixée à 200W. L'énergie des MO est de 1200 kJ/kg. Elle est calculée comme suit :

$$W_{MO} = (P \cdot t) / m \quad (2.3)$$

où P est la puissance du générateur de MO (W), t est le temps (s) et m est la masse du produit (kg).

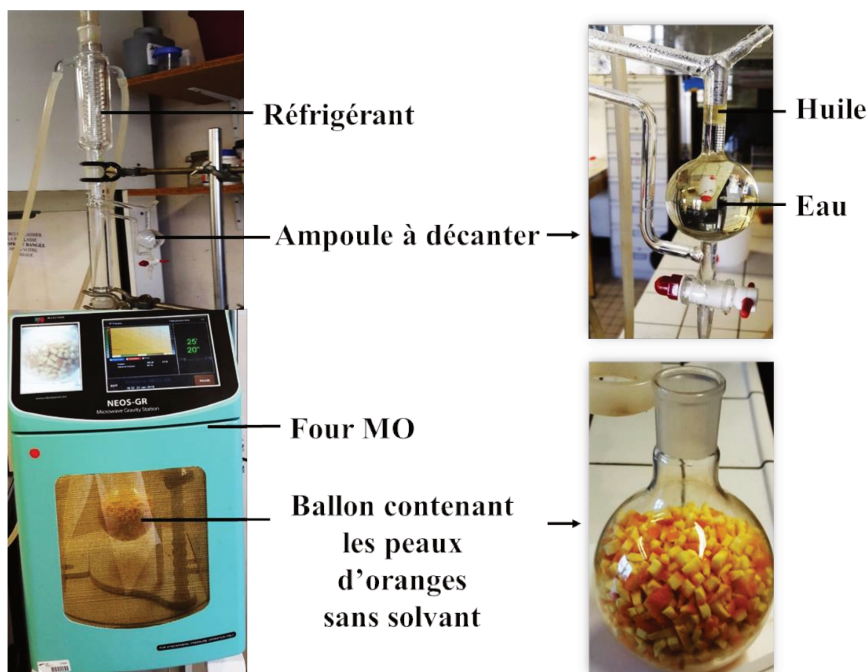
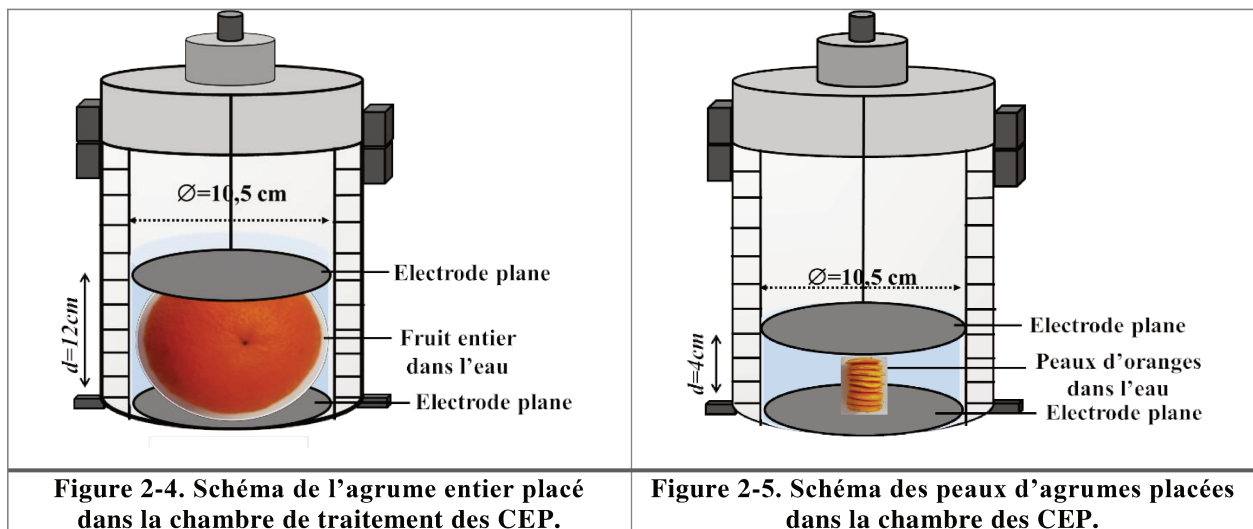
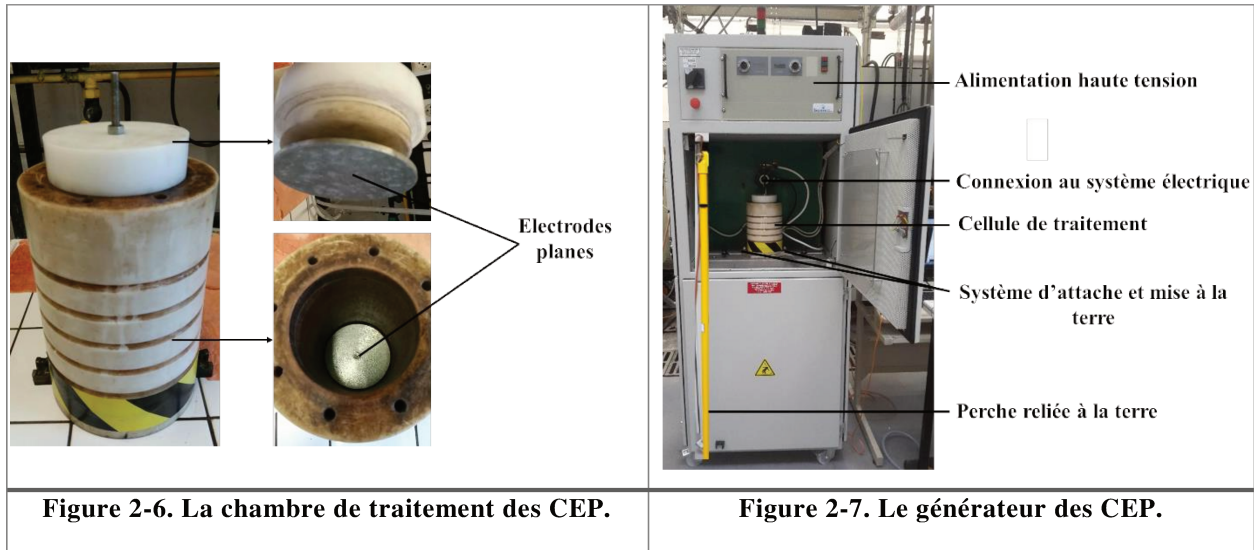


Figure 2-3. Extraction des huiles essentielles à partir des peaux d'oranges, avec les MO sans solvant.

2.2.2. Les champs électriques pulsés

Les agrumes entiers ou les peaux d'oranges sont placés dans une chambre de traitement cylindrique en téflon remplie d'eau entre deux électrodes planes (Figures 2-4 et 2-5). L'une des deux électrodes est reliée au générateur et l'autre à la terre. Les électrodes de 105 mm de diamètre sont en acier inoxydable (Figure 2-6). La distance entre les deux électrodes est fixée à 12 cm pour les fruits entiers et à 4 cm pour les peaux d'oranges. La chambre de traitement est connectée à un générateur qui fournit une tension maximale de 40 kV et un courant de 10 kA (Figure 2-7). L'intensité du champ électrique ($E=U/d$) est donc égale à 3 kV/cm et 10 kV/cm pour les agrumes entiers et les peaux d'oranges, respectivement. Le traitement électrique consiste en une application d'un certain nombre d'impulsions n dans le produit placé entre les deux électrodes de la chambre de traitement. L'application des impulsions successives permet la perméabilisation du tissu végétal sans élévation significative de la température ΔT pendant le traitement. La durée d'une impulsion est $t_i=70 \mu s$ et l'intervalle de temps entre les impulsions est $\Delta t=2 s$. La température est enregistrée au centre de l'échantillon durant le traitement avec les champs électriques pulsés (CEP), à l'aide d'un thermocouple Thermocoax de type 2 (AB 25 NN) en téflon. La valeur de ΔT était presque proportionnelle au nombre d'impulsions n . L'énergie spécifique par impulsion est évaluée : $\Delta W_{CEP} = C\Delta T \approx 0.16 \text{ kJ/kg}$, où $C \approx 3,91 \text{ kJ/kg}^\circ\text{C}$ est la capacité thermique spécifique de l'orange. Les valeurs similaires de ΔW ont été estimées pour les autres agrumes.





2.2.3. Les décharges électriques de haute tension

Les peaux d'agrumes (20 g) et l'eau (160 g à 50°C) sont introduits dans la chambre de traitement des décharges électriques de haute tension (DEHT) (Figure 2-8). La distance d entre les électrodes est fixée à 5 mm. La chambre de traitement des DEHT est différente de celle des CEP (Figure 2-9). Elle est constituée d'une électrode pointe ($d=10$ mm) reliée au générateur et d'une électrode plane ($d=35$ mm) reliée à la terre. La distance entre les électrodes peut varier de 2 mm à 10 mm. Le générateur des DEHT est le même que celui précédemment cité pour les champs électriques pulsés (Figure 2-10). Les DEHT sont appliqués pour une durée allant de 0 à 40 min. L'énergie W_{DEHT} (kJ/kg) consommée par les DEHT est calculée comme suit:

$$W_{DEHT} = (W_i * n) / m \quad (2.4)$$

où W_i est l'énergie d'une impulsion électrique (J), n est le nombre d'impulsions et m est la masse du produit (kg).

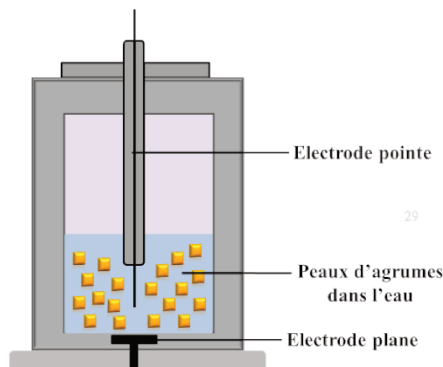
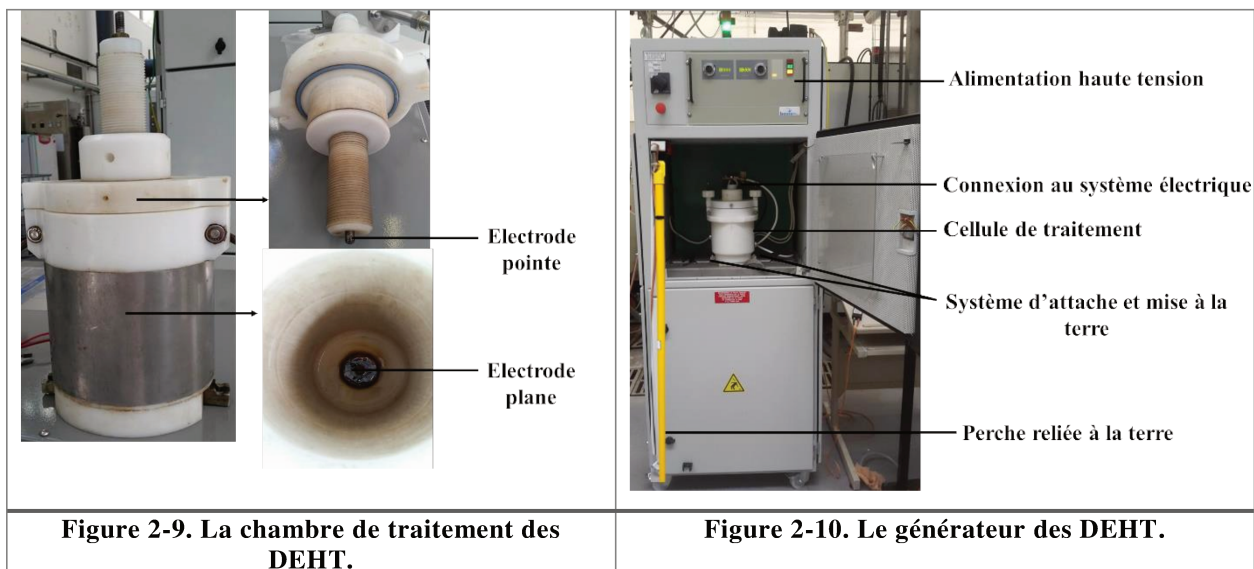


Figure 2-8. Schéma des peaux d'agrumes placées dans la chambre des DEHT.



2.2.4. Les ultrasons

L'extraction est réalisée à l'aide d'un générateur UP 400S (Hielscher GmbH, Allemagne) relié à une sonde à ultrasons (US) en titane (H14 Hielscher GmbH, Allemagne), de 14 mm de diamètre et d'une longueur totale de 100 mm. Le générateur fonctionne à une puissance maximale de 400 W et une fréquence de 24 kHz. La sonde est immergée dans un bécher contenant les peaux d'agrumes et le solvant (Figure 2-11). L'amplitude est fixée à 100%, ce qui correspond à la puissance nominale de 400 W. L'augmentation de la température ΔT durant le traitement avec les US est enregistrée. L'énergie spécifique par minute est évaluée comme $\Delta W_{US} = C\Delta T = 8,96 \text{ kJ/kg}$, où $C = 3,32 \text{ kJ/kg } ^\circ\text{C}$ est la capacité calorifique spécifique du solvant (50% éthanol /eau (v/v)).

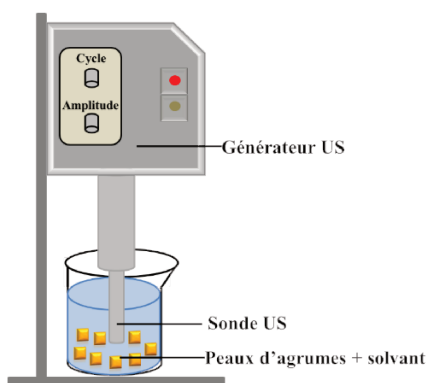


Figure 2-11. Schéma des ultrasons.

2.2.5. Les infrarouges

2.2.5.1. Traitement par les infrarouges

Les peaux d'oranges sont placées dans un ballon avec de l'éthanol-eau (ratio liquide-solide égal à 8). Le ballon est suspendu au-dessus d'un émetteur de rayons infrarouges en céramique (puissance 70 W), relié à un système de régulation PID (Figure 2-12). La température et le voltage peuvent être ajustés grâce à ce système. L'augmentation de la température dans le solvant, durant le traitement IR est enregistrée à l'aide d'un thermocouple Thermocoax de type 2 (AB 25 NN). L'énergie spécifique par minute peut être évaluée comme $\Delta W_{IR} = C\Delta T \approx 17$ kJ/kg, où $C \approx 3,32$ kJ/kg°C est la capacité thermique spécifique du solvant (50% éthanol /eau (v/v)). La concentration en éthanol (15, 35 et 55%), la durée de traitement (0,5, 1 et 1,5 h) et la température (50, 65 et 80°C) sont optimisées par la méthode des surfaces de réponses. Les variables sont codées et 20 expériences sont réalisées (Tableau 2-1).

2.2.5.2. Prétraitement des peaux par les infrarouges

Les peaux d'oranges sont aussi prétraitées avec les infrarouges sans l'ajout d'aucun solvant. Le but est l'augmentation des rendements et des cinétiques d'extraction des polyphénols durant le traitement avec les ultrasons. Les peaux d'oranges (200 g) sont placées dans un ballon, sur l'émetteur des rayons infrarouges, pour une durée de 20 min. L'augmentation de la température durant le prétraitement IR est enregistrée à l'intérieur des peaux d'oranges. L'énergie spécifique par minute est évaluée comme $\Delta W_{IR} = C\Delta T \approx 3,98$ kJ/kg, où $C \approx 3,61$ kJ/kg°C est la capacité thermique spécifique des peaux d'oranges.

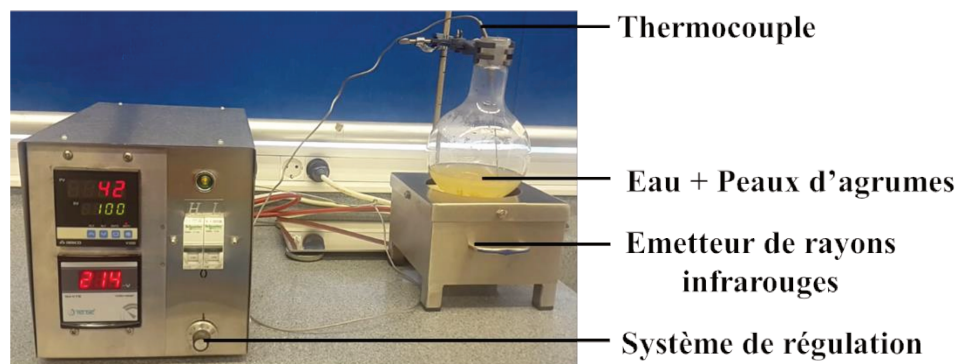


Figure 2-12. Le système de chauffage par les infrarouges.

Tableau 2-1. Plan d'expérience pour l'extraction des composés phénoliques avec les infrarouges, en variant le temps, la température et le pourcentage éthanol-eau.

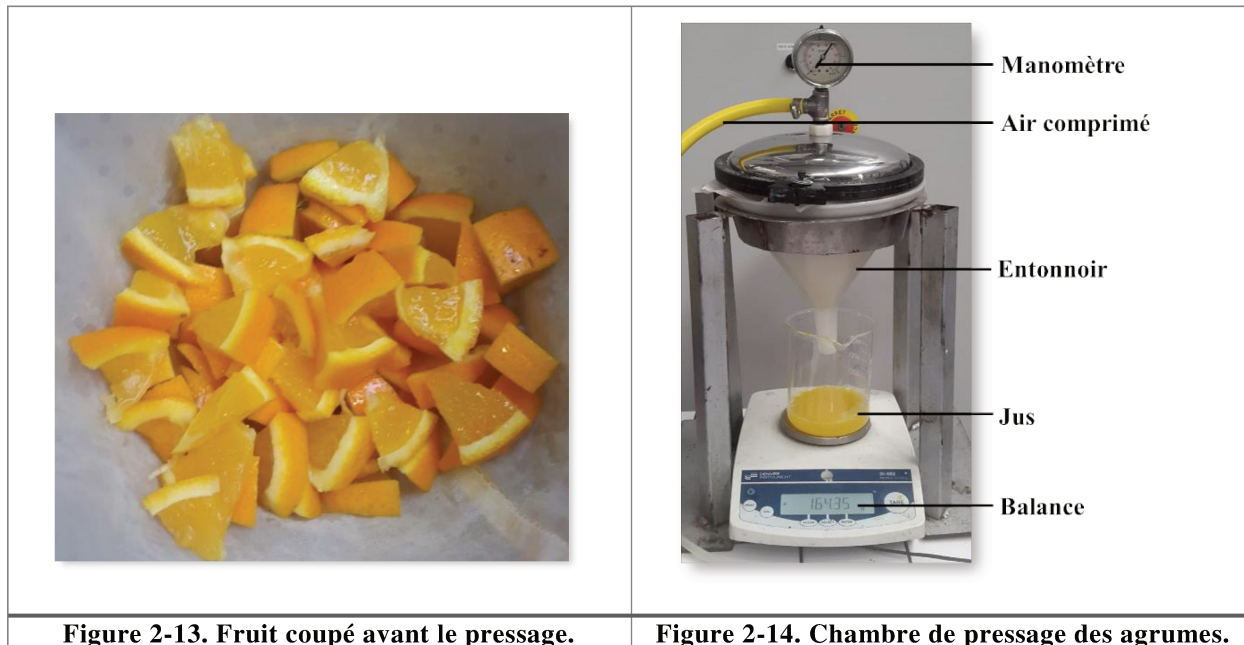
Essai	Variable codée/non codée					
	Ethanol, (%)		Temps, (h)		Température, (°C)	
1	15	(-1)	0,5	(-1)	40	(-1)
2	55	(+1)	0,5	(1)	40	(-1)
3	15	(-1)	1,5	(+1)	40	(-1)
4	55	(+1)	1,5	(+1)	40	(-1)
5	15	(-1)	0,5	(-1)	70	(+1)
6	55	(+1)	0,5	(-1)	70	(+1)
7	15	(-1)	1,5	(+1)	70	(+1)
8	55	(+1)	1,5	(+1)	70	(+1)
9	1,36	(- α)	1	(0)	55	(0)
10	68,63	(+ α)	1	(0)	55	(0)
11	35	(0)	0,16	(- α)	55	(0)
12	35	(0)	1,84	(+ α)	55	(0)
13	35	(0)	1	(0)	29,77	(- α)
14	35	(0)	1	(0)	80,23	(+ α)
15,16,17,18,19,20	35	(0)	1	(0)	55	(0)

2.3. Extraction par pressage

Les agrumes (orange, pomelo, citron) intacts ou traités avec les CEP, sont coupés manuellement en des tranches similaires (Figure 2-13). Une chambre de pressage (Sofralab, France) est utilisée pour l'extraction du jus (Figure 2-14). Les morceaux sont placés dans un compartiment hémisphérique. Une pression constante de 4 bars est appliquée à partir d'un compresseur d'air jusqu'aux tranches de fruits à travers un diaphragme élastique. La durée du pressage est fixée à 30 min. Le rendement en jus est calculé comme suit:

$$Y (\%) = (M/M_i) * 100 \quad (2.5)$$

où M est la masse du jus obtenu après pressage et M_i est la masse initiale du fruit entier avant pressage.



2.4. Extraction solide-liquide conventionnelle

Les peaux d'oranges fraîches sont placées avec le solvant d'extraction dans des erlenmeyers de 500 mL, avec un ratio liquide-solide égal à 8. L'extraction est réalisée dans un bain-marie. Pour éviter l'évaporation du solvant, les erlenmeyers sont fermés pendant le procédé d'extraction.

L'effet du pourcentage en éthanol, du temps et de la température d'extraction, sur la quantité et la qualité des polyphénols extraits à partir des peaux d'oranges, est étudié par un plan composite centré (2^3 +étoiles). Le pourcentage en éthanol (entre 50% et 80%), le temps d'extraction (entre 2 h et 4 h) et la température (entre 40°C et 70°C) sont variés. Les variables sont codées et 20 expériences sont réalisées (Tableau 2-2).

Tableau 2-2. Plan d'expérience pour l'extraction solide-liquide des composés phénoliques, en variant le temps, la température et le pourcentage éthanol-eau.

Essai	Variable codée/non codée					
	Ethanol, (%)		Temps, (h)		Température, (°C)	
1	50	(-1)	2	(-1)	40	(-1)
2	80	(+1)	2	(-1)	40	(-1)
3	50	(-1)	4	(+1)	40	(-1)
4	80	(+1)	4	(+1)	40	(-1)
5	50	(-1)	2	(-1)	70	(+1)
6	80	(+1)	2	(-1)	70	(+1)
7	50	(-1)	4	(+1)	70	(+1)
8	80	(+1)	4	(+1)	70	(+1)
9	39,77	(- α)	3	(0)	55	(0)
10	90,22	(+ α)	3	(0)	55	(0)
11	65	(0)	1,32	(- α)	55	(0)
12	65	(0)	4,68	(+ α)	55	(0)
13	65	(0)	3	(0)	29,77	(- α)
14	65	(0)	3	(0)	80,23	(+ α)
15,16,17,18,19,20	65	(0)	3	(0)	55	(0)

2.4.1. Extraction solide-liquide dans les solvants verts

2.4.1.1. Extraction solide-liquide dans les solvants eutectiques profonds

Préparation des solvants eutectiques profonds

Les composants de chaque solvant sont mélangés dans un flacon en verre avec un certain ratio molaire (Tableau 2-3). Le mélange est chauffé à une température de 80°C pendant 2 à 6 h jusqu'à l'apparition d'un liquide transparent (Figure 2-15). Pour diminuer la viscosité de tous les solvants

préparés, 30% d'eau sont ajoutées. Les flacons sont gardés à l'obscurité, à température ambiante jusqu'à l'utilisation des solvants.

Tableau 2-3. Les solvants eutectiques profonds préparés.

Composant 1	Composant 2	Ratio molaire	Code
Choline-chloride	Acide lactique	3:1	S-1
	Acide tartrique	2:1	S-2
Acide lactique	Sodium acétate	3:1	S-3
	Ammonium acétate	3:1	S-4
	Glycine	3:1	S-5
	Glucose	5:1	S-6

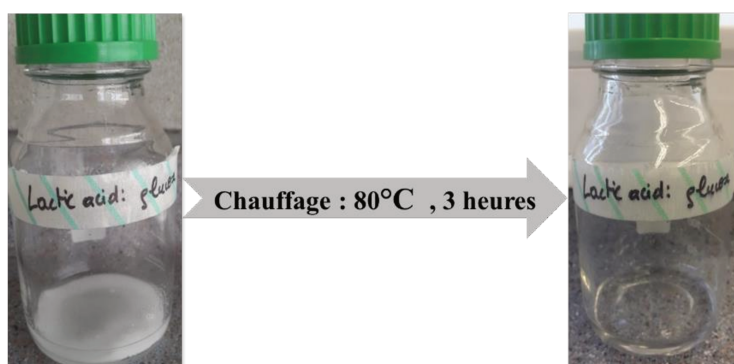


Figure 2-15. Aspect du solvant eutectique profond obtenu, constitué d'acide lactique et de glucose avec comme proportion 5:1.

Extraction

Le solvant préparé est ajouté sur la poudre de peaux de pamplemousses sèches ou sur les peaux fraîches prétraitées avec les DEHT ($n=100$), avec un ratio liquide-solide égal à 10. L'extraction est réalisée dans un bain marie à 50°C pendant 60 min. Les solvants testés sont comparés aux solvants conventionnels d'extraction qui sont l'eau et l'éthanol.

2.4.1.2. Extraction solide-liquide dans le glycérol

Le glycérol est utilisé comme co-solvant avec l'eau à des pourcentages de 10, 20 et 30% (masse/volume). La poudre de peaux de pamplemousses sèches ou les peaux fraîches prétraitées avec les DEHT ($n=10$ à 300) sont placées avec le mélange glycérol-eau, avec un ratio liquide-solide égal à 10. L'extraction est réalisée dans un bain marie à 50°C pendant 60 min.

2.4.2. Extraction solide-liquide assistée par les enzymes

La Viscozyme® L est un mélange enzymatique contenant l'arabanase, la cellulase, la β -glucanase, l'hémicellulase et la xylanase. Les peaux d'oranges fraîches sont placées dans un erlenmeyer contenant de l'eau préchauffée à 50°C, et l'enzyme à une concentration de 12 FBGU/g de peau d'agrumes. Le ratio liquide-solide est fixé à 8. L'hydrolyse enzymatique est réalisée dans un incubateur (Infors HT Aeroton, France), pour une durée allant de 2 à 180 min, dans les conditions optimales du déroulement de la réaction enzymatique (50°C à pH 4,5).

2.5. Analyses physico-chimiques

2.5.1. Analyse des produits solides

2.5.1.1. Mesures acoustiques

Les mesures d'acoustiques sont réalisées à l'aide d'un capteur de fermeté acoustique (Aweta DFT, Version 0.0.0.7., Nootdorp, Netherlands) (Figure 2-16). Un capteur est placé sur la surface du fruit. Après une série de coups avec un petit marteau, le fruit résonne à une certaine fréquence f (Hz) (Figure 2-17). Le signal est capté et modifié par la méthode de Fourier. L'indice de fermeté F ($\text{Hz}^2 \cdot \text{g}/\text{cm}$) du fruit est défini comme $f^2 * m^{2/3} * \rho^{1/3}$ où m et ρ sont la masse (g) et la masse volumique du fruit (g/cm^3). L'indice de désintégration acoustique est calculé comme suit :

$$Z_a = (F - F_i) / (F_d - F_i) \quad (2.6)$$

où F est l'indice de fermeté du fruit traité avec les CEP, F_i est l'indice de fermeté du fruit intact et F_d est l'indice de fermeté du fruit endommagé par congélation/décongélation.

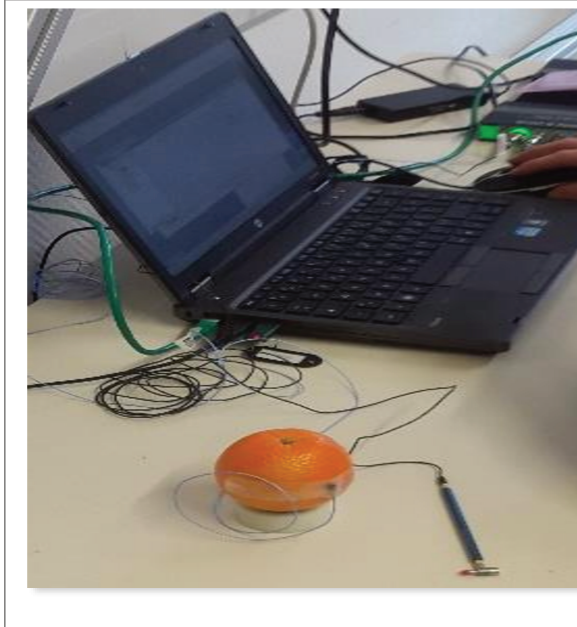


Figure 2-16. Système de mesures acoustiques.

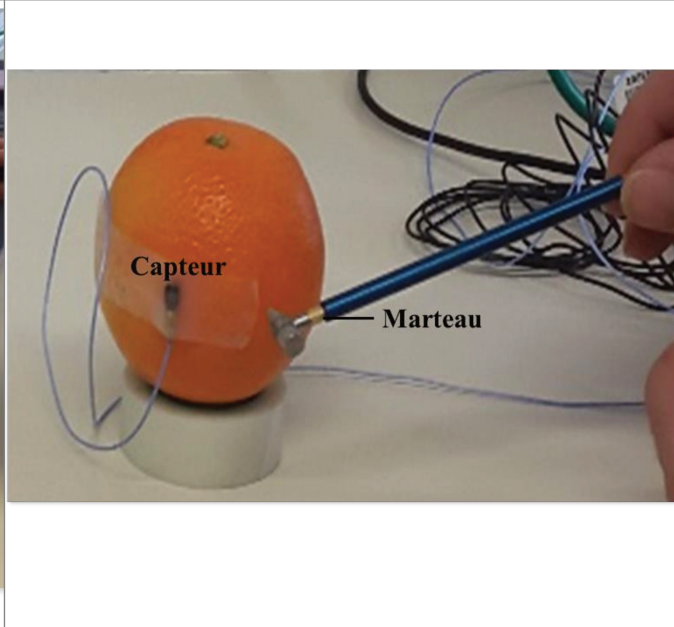


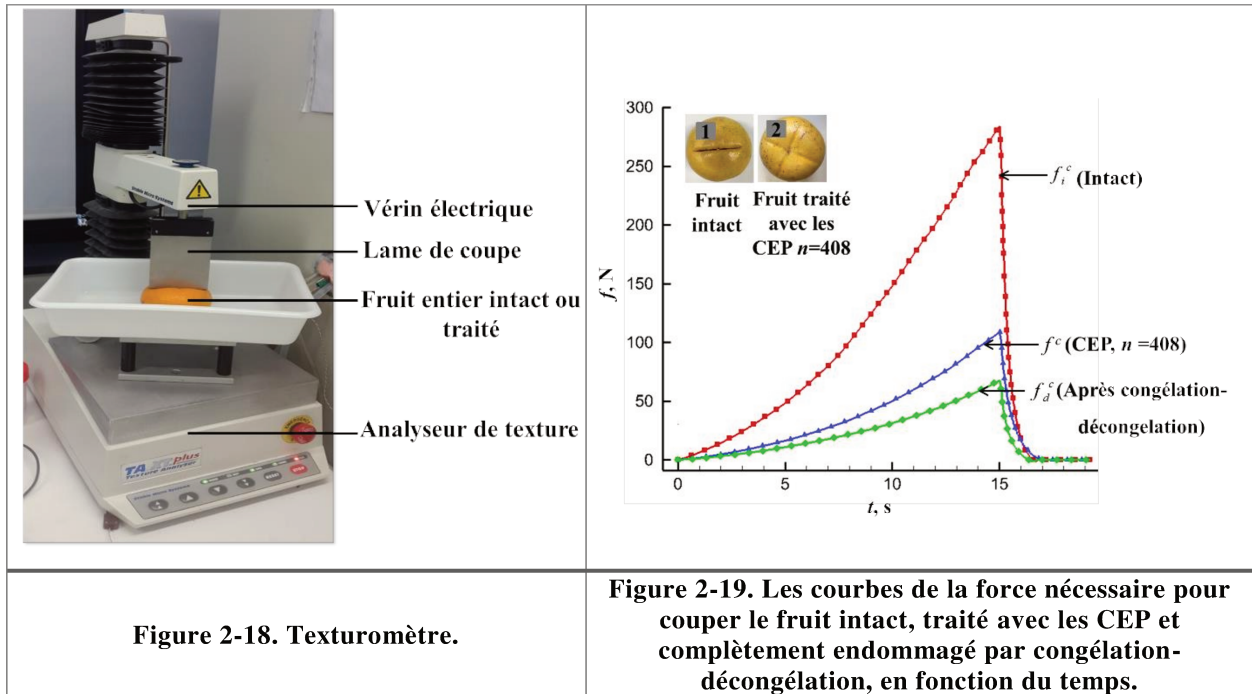
Figure 2-17. Capteur de fermeté acoustique.

2.5.1.2. Mesures de texturométrie

Les mesures de texturométrie sont effectuées avec un texturomètre TA-XT plus (Rhéo, Champlan, France) équipé d'une lame de coupe, qui mesure la force f^c requise pour couper le fruit (Figure 2-18). Le traitement des fruits entiers avec les CEP, diminue la force nécessaire pour les couper (Figure 2-19). La vitesse de déplacement de la lame est fixée à 1 mm/s. L'indice de désintégration textural est calculé selon la formule suivante :

$$Z_t = (f^c - f_i^c) / (f_a^c - f_i^c) \quad (2.7)$$

où f^c est la force nécessaire (N) pour couper le fruit traité avec les CEP, f_i^c est la force nécessaire pour couper le fruit intact et f_a^c est la force nécessaire pour couper le fruit endommagé par congélation/décongélation.

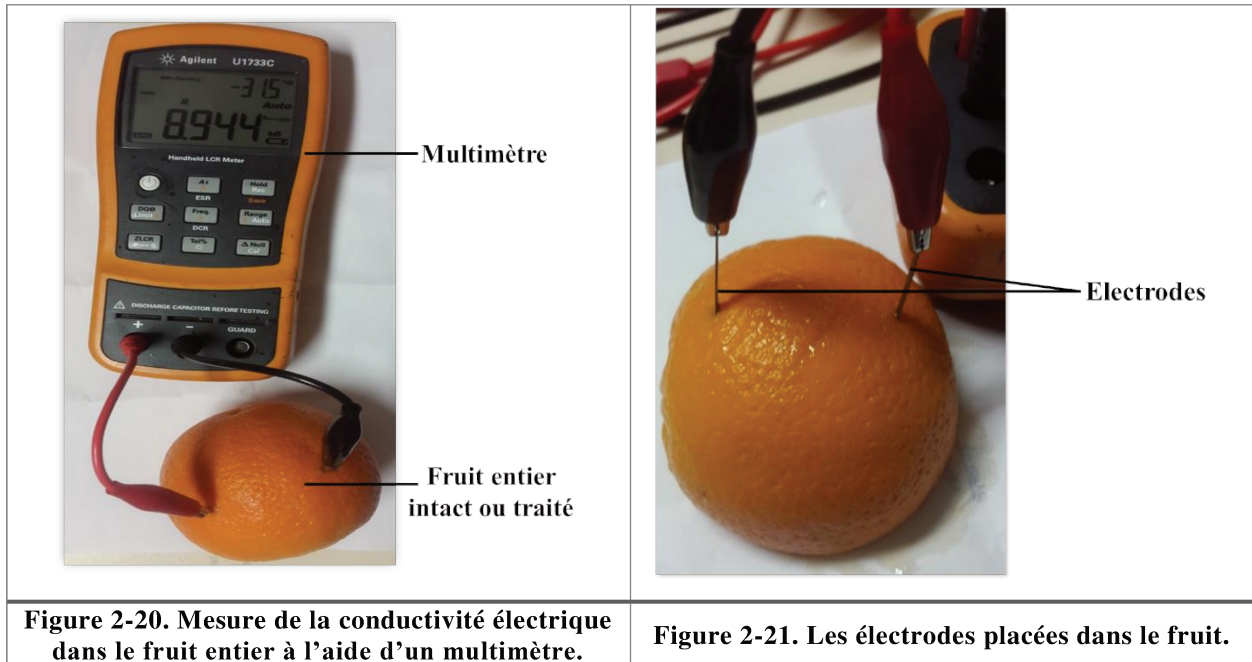


2.5.1.3. Mesures de la conductivité électrique à l'intérieur du fruit entier

La conductivité électrique σ à l'intérieur du fruit entier est mesurée à l'aide d'un multimètre 819 (Instek, 12–100 kHz) (Figure 2-20). Deux électrodes (avec une surface de 30 mm^2), distantes de 40 mm, sont insérées dans la partie centrale du fruit entier (Figure 2-21). L'indice de désintégration de la conductivité électrique est calculé comme suit :

$$Z_c = (\sigma - \sigma_i) / (\sigma_d - \sigma_i) \quad (2.8)$$

où σ (S/m) est la conductivité électrique à l'intérieur du fruit traité avec les CEP, σ_i est la conductivité électrique à l'intérieur du fruit intact et σ_d est la conductivité électrique à l'intérieur du fruit endommagé par congélation-décongélation.



2.5.1.4. Granulométrie

La fragmentation du produit après le traitement électrique, est évaluée en déterminant la distribution des tailles des particules par granulométrie. L'appareil utilisé Mastersizer 2000 (Malvern instruments UK), est composé d'une source lumineuse (faisceau laser de 2 mW He-Ne, $\lambda = 632,8 \text{ nm}$), d'une lentille optique et d'un détecteur de lumière. Le principe repose sur la mesure de la variation angulaire de l'intensité de lumière diffusée lors du passage d'un faisceau laser à travers un échantillon.

2.5.2. Analyse des extraits liquides

2.5.2.1. Mesure de la conductivité électrique

La mesure de la conductivité électrique d'une solution renseigne sur sa concentration en molécules chargées. Elle permet d'estimer le taux d'endommagement cellulaire du produit après un traitement. Les mesures des conductivités sont réalisées à l'aide d'un conductimètre. Les résultats sont exprimés en S/m. L'indice de perméabilisation Z est déterminé par l'équation suivante:

$$Z_c = (\sigma_t - \sigma_i) / (\sigma_d - \sigma_i) \quad (2.9)$$

où σ_t est la conductivité électrique mesurée au temps t (S/m), σ_i est celle du produit intact au temps t_0 (S/m), σ_d est la conductivité électrique du produit complètement endommagé par broyage (S/m).

Selon cette équation, un tissu intact aurait un $Z=0$ ($\sigma_t = \sigma_i$), et un tissu totalement endommagé aurait un $Z=1$ ($\sigma_t = \sigma_d$).

2.5.2.2. Quantification des polyphénols totaux

2.5.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux par une méthode colorimétrique

La teneur en polyphénols totaux est déterminée par le dosage colorimétrique de Folin-Ciocalteu (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventós, 1998). Les extraits phénoliques (0,2 mL) sont mélangés avec 1 mL du réactif Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois). 0,8 mL de carbonate de sodium (75 g/L) sont ensuite rajoutés. Le mélange est incubé pendant 10 min à 60°C. Après refroidissement, l'absorbance est mesurée à 750 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. L'acide gallique est utilisé comme standard pour tracer la courbe d'étalonnage.

2.5.2.2.2. Quantification des polyphénols totaux par chromatographie liquide à haute performance

Un appareil de Chromatographie liquide Ultimate 3000 (Dionex, Idstein, Allemagne) couplé à un détecteur à barrette de diodes et une colonne C18, colonne capillaire 100 x 4,6 mm (Hypersil Gold, Thermo Scientific, USA), sont utilisés. La température de la colonne est maintenue à 30°C. La phase mobile A est composée de 97% d'eau, 3% d'acétonitrile et 0,1% d'acide trifluoroacétique. La phase mobile B est constituée de 100% d'acétonitrile. Le profil d'élution du solvant B est le suivant: 10 min, 2% ; 25 min, 6% ; 40 min, 15% ; 52 min, 20% ; 70 min, 40%. Les extraits sont injectés à un volume de 100 μ L et un débit de 1,250 mL/min. La détection est effectuée à des longueurs d'onde allant de 250 nm à 310 nm. La quantification est réalisée en utilisant la méthode d'étalonnage externe. L'hespéridine, la naringine et l'ériocitrine (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) sont les standards utilisés. Ils sont tous solubilisés dans 50% éthanol-eau. Les extraits des peaux d'agrumes dilués dans 50% éthanol-eau, et les standards sont filtrés à travers des membranes de polyéthersulfone de 0,2 μ m avant leur analyse par HPLC.

2.5.2.3. Dosage des sucres réducteurs

La concentration en sucres réducteurs est déterminée par une méthode colorimétrique (Miller, 1959). L'acide 3,5- dinitrosalicylique ou DNS est un oxydant qui est réduit par les sucres réducteurs en acide 3-amino-5-nitrosalicylique de couleur rouge. 0,5 mL d'extrait et 1 mL du réactif DNS sont mélangés puis incubés à 100°C pendant 5 min. Après refroidissement,

l'absorbance est mesurée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le glucose est utilisé pour tracer la courbe d'étalonnage.

2.5.2.4. Détermination de la bioactivité des polyphénols

2.5.2.4.1. Activité antiradicalaire

L'activité antiradicalaire des polyphénols extraits est mesurée par leur capacité à piéger le radical libre DPPH 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995). La réduction du DPPH de couleur violette intense par les polyphénols se manifeste par une diminution progressive de cette couleur. 1,45 mL de radical DPPH (0,06 mM) (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) sont ajoutés sur 50 µl d'extraits ou de Trolox (contrôle) (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France). Après 30 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 515 nm.

Le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH est calculé comme suit :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = \frac{[\text{absorbance du contrôle} - \text{absorbance de l'échantillon}] / \text{absorbance du contrôle} \times 100. \quad (2.10)$$

L'activité antiradicalaire est calculée grâce à une gamme étalon montrant l'absorbance en fonction des différentes concentrations en Trolox.

2.5.2.4.2. Activité antifongique

L'effet des extraits phénoliques extraits à partir des peaux d'agrumes, sur la croissance d'un champignon toxigène *Aspergillus flavus* et la sécrétion de la toxine aflatoxine B1 (AFB1) par ce même champignon, est testé. La souche *A. flavus* NRRL 62477 est utilisée.

Après la croissance de la souche *A. Flavus* sur un milieu gélose à extrait de levure Czapek (CYA) à 30°C pendant 7 jours, une suspension de spores est préparée. A l'aide d'une pipette Pasteur stérile (Chase Scientific Glass, Inc., Rokwood, TN, USA), une partie de la culture préparée est prélevée et mélangée avec 8 mL d'une solution de Tween 80 (0,005%). Les spores sont comptées sur un hémocytomètre Neubauer (Superior, Marienfeld, Lauda-Konigshofen, Allemagne) et la concentration en spores est ajustée à 10⁶ spores/mL. La suspension de spores est conservée à 4°C jusqu'à son utilisation.

Inhibition de la croissance fongique

Les extraits phénoliques (250 µg) sont ajoutés dans le milieu CYA et un volume final de 20 mL est versé dans chaque boîte de Pétri. Pour le témoin négatif, 20 mL de CYA dépourvus d'extraits phénoliques sont versés dans la boîte de pétri. Ensuite, 10 µl de la solution de spores précédemment préparée (10⁶ spores/mL) sont ajoutés au centre de chaque boîte de pétri. Les essais sont réalisés en triplicat et toutes les boîtes de pétri sont mises dans l'incubateur à 28°C pendant 4 jours. Après cette période d'incubation, l'inhibition de la croissance du champignon *A. flavus* est déterminée. Les diamètres des cultures sont mesurés et comparés avec le témoin négatif. Le pourcentage d'inhibition du champignon est calculé comme suit :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = (\text{Diamètre initial} - \text{Diamètre après incubation}) / (\text{Diamètre initial}) * 100 \quad (2.11)$$

Extraction de l'aflatoxine B1 et sa quantification par HPLC

Après 7 jours d'incubation à 28°C sur le milieu CYA, 3 bouchons d'agar (0,5 cm de diamètre) sont prélevés à différents points de la colonie pour chaque culture, pesés et placés dans des tubes de 3 mL. 1 mL de méthanol sont ajoutés à chaque tube. Le mélange est gardé à température ambiante pendant 60 minutes avec agitation. Après centrifugation pendant 15 minutes à 13 000 tours par minute, le surnageant est récupéré et diluée avec 11 mL de tampon phosphate. L'extrait dilué est injecté dans des colonnes d'immunoaffinité Aflaprep (R-Biopharm, Glasgow, Ecosse). Une élution est effectuée en ajoutant 1,5 mL de méthanol/acide acétique (98: 2, v/v) puis 1,5 mL d'eau. Le volume total est filtré sur des filtres de 0,45 µm (Sartorius stedim, Biotech) puis stocké à 4°C avant la quantification. La quantification de l'aflatoxine B1 est effectuée par HPLC en utilisant une colonne (Utisphere ODB), C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm, 120 Å) (Interchim, Montluçon, France) à 30°C.

2.6. Modélisation de la cinétique d'extraction suivant la loi de Fick

La diffusion des molécules bioactives est étudiée en utilisant la seconde loi de Fick. La géométrie des peaux d'agrumes est considérée comme plane. La diffusion dans une surface plane, avec agitation et dans un volume limité suit la formule suivante :

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2\alpha(\alpha+1)\exp(-Dq_n^2 t/l^2)}{1+\alpha+q_n^2 \alpha^2} \quad (2.12)$$

où M_t est la concentration du soluté dans l'extrait après un temps t , M_∞ est la concentration maximale du soluté après un temps infini, α , est le ratio liquide-solide, D est le coefficient de diffusion (m^2/s), l est la dimension caractéristique du solide. Pour $\alpha=10$ et $n=5$: $q_1=1,5708$, $q_2=4,7124$, $q_3=7,854$, $q_4=10,9956$ and $q_5=14,1372$ (Crank, 1975).

2.7. Les paramètres de solubilité de Hansen

La méthode des paramètres de solubilité a été mise au point par Charles M. Hansen dans les années 1960. Les paramètres de solubilité permettent à l'expérimentateur de trouver facilement les solvants adéquats à la solubilisation des molécules d'intérêt.

Le paramètre de solubilité est divisé en 3 composantes principales : les forces dites de dispersion de London δ_D , les forces de polarité de Keesom δ_P (entre dipôles permanents), et les forces de liaison hydrogène δ_H . Hansen obtient ainsi un espace à trois dimensions. Dans cet espace, toutes les substances liquides ou solides peuvent être localisées, en supposant que l'énergie totale de cohésion des substances (δ) est la somme des énergies intermoléculaires (δ_D , δ_P , δ_H) de telle sorte que l'on peut écrire :

$$\delta = \sqrt{\delta_D^2 + \delta_P^2 + \delta_H^2} \quad (2.13)$$

De manière pratique, on calcule pour chaque liquide, les valeurs des paramètres δ_D , δ_P et δ_H , puis on porte ces grandeurs selon les trois axes de cet espace. Le point correspondant représente la combinaison des interactions qui assure la cohésion du liquide. Pour qu'une substance solide quelconque soit soluble dans un liquide, ou que deux liquides soient miscibles entre eux, il faut que leur situation dans l'espace soit voisine, c'est-à-dire que leurs paramètres de solubilité soient proches. La puissance de la méthode vient de la possibilité de travailler sur les mélanges de solvants, sachant que les paramètres de solubilité d'un mélange sont proportionnels aux fractions volumiques des constituants du mélange.

2.7.1. Calcul des paramètres de solubilité de Hansen

Pour chaque composé ou solvant, les paramètres de solubilité de Hansen sont calculés en utilisant la méthode de Hoftyzer et Krevelen (Van Krevelen & Nijenhuis, 2009) :

$$\delta_d = \Sigma F_{Di} / V \quad (2.14)$$

$$\delta_P = \sqrt{\sum F_{Pi}^2} / V \quad (2.15)$$

$$\delta_H = \sqrt{\sum E_{Hi}} / V \quad (2.16)$$

où F_{Di} et F_{Pi} correspondent aux forces de dispersion et aux composants polaires présents dans chaque groupe structural (J/cm^3)^{1/2}/mol; E_{Hi} est la liaison par pont d'hydrogène par groupe structural (J/mol) et V (cm^3/mol) est le volume molaire de la molécule. Pour chaque groupe structural, les valeurs de F_{Di} , F_{Pi} , E_{Hi} sont tirées de la littérature (Van Krevelen & Nijenhuis, 2009).

2.7.1.1. Un exemple de calcul des paramètres de solubilité

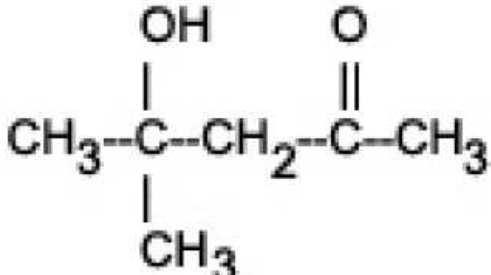
Voici un exemple de calcul des paramètres de solubilité de Hansen selon la méthode de Hoftyzer et Krevelen (Li, 2015). Dans notre étude, nous avons calculé tous les paramètres de solubilité selon cette méthode. Pour certains solvants, les paramètres de solubilité sont présents dans la littérature. Ce qui nous a permis de comparer les valeurs obtenues selon cette méthode avec les valeurs présentes dans la littérature.

La figure 2-22 montre la structure du diacétone. La figure 2-23 présente la somme des valeurs de F_{Di} (J/cm^3)^{1/2}/mol, F_{Pi} (J/cm^3)^{1/2}/mol et E_{Hi} (J/mol) pour chaque groupe structural du diacétone. Le volume molaire du diacétone est égal à 123,8 cm^3/mol . Selon les formules citées dans la partie 2.7.1. de ce chapitre, on peut calculer les différents paramètres de solubilité δ_D , δ_P et δ_H comme suit :

$$\delta_D = \sum F_{Di} / V = 1960 / 123,8 = 15,8 \text{ J}^{1/2} / \text{cm}^{3/2} \quad (2.17)$$

$$\delta_P = \sqrt{\sum F_{Pi}^2} / V = \sqrt{843000} / 123,8 = 7,4 \text{ J}^{1/2} / \text{cm}^{3/2} \quad (2.18)$$

$$\delta_H = \sqrt{\sum E_{Hi}} / V = \sqrt{22000} / 123,8 = 13,3 \text{ J}^{1/2} / \text{cm}^{3/2} \quad (2.19)$$

		F_{di}	F_{pi}^2	E_{hi}
	3 -CH ₃	1260	0	0
	1 -CH ₂ -	270	0	0
	1 >C<	-70	0	0
	1 -CO-	290	593000	2000
	1 -OH	210	250000	20000
		1960	843000	22000
Figure 2-22. La structure du diacétone.	Figure 2-23. Les valeurs de F_{Di} , F_{Pi} et E_{Hi} pour les groupes structuraux du diacétone.			

2.7.2. La sphère de Hansen

Les paramètres de solubilité calculés, peuvent être placés sur trois axes x, y, et z. Une sphère peut alors être tracée dans l'espace (Figure 2-24).

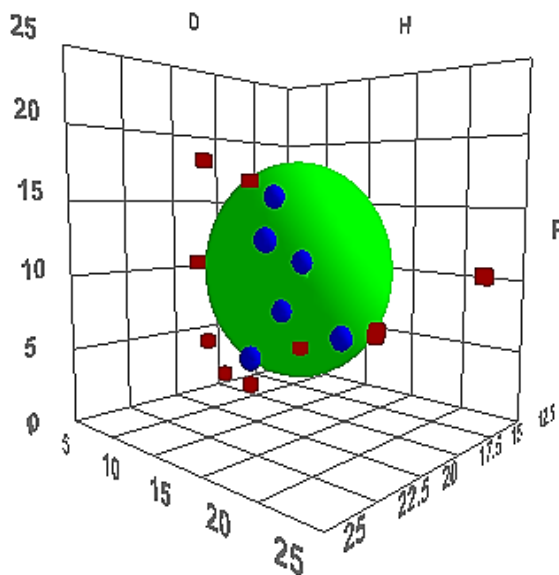


Figure 2-24. La sphère de Hansen. Le centre de la sphère correspond aux paramètres de solubilité du soluté d'intérêt. Les points bleus correspondent aux « bons » solvants et les carrés rouges sont les « mauvais » solvants.

Le centre de la sphère correspond aux paramètres de solubilité du soluté à étudier. Le rayon de la sphère est déterminé expérimentalement. Il correspond aux paramètres de solubilité du solvant le moins efficace. Les solvants efficaces et adéquats pour la solubilisation du soluté d'intérêt sont ceux qui sont à l'intérieur de la sphère. Les solvants qui ne sont pas adéquats à la solubilisation du soluté seront donc à l'extérieur de la sphère. La sphère est dessinée sur le programme Matlab 2015b. Pour chaque expérience, on peut donc choisir les « bons » solvants pour l'extraction des molécules d'intérêt en traçant la sphère de Hansen.

2.8. Optimisation par la méthodologie de surface de réponse

La méthode des plans d'expériences permet d'obtenir le maximum d'informations sur les paramètres opératoires qui influencent sur un processus ou un système, avec une optimisation des résultats. Les objectifs des plans d'expériences sont de diminuer le nombre d'essais, de connaître les effets des paramètres, de déduire les paramètres influents, d'évaluer les interactions entre les paramètres, d'avoir une meilleure précision sur les résultats et d'établir une modélisation empirique de la réponse. La méthodologie de surface de réponse est une collection de stratégies expérimentales de méthodes mathématiques et statistiques, qui permet à un expérimentateur de choisir la meilleure des combinaisons des niveaux des paramètres qui optimise un processus.

2.8.1. Plan composite centré à 3 facteurs

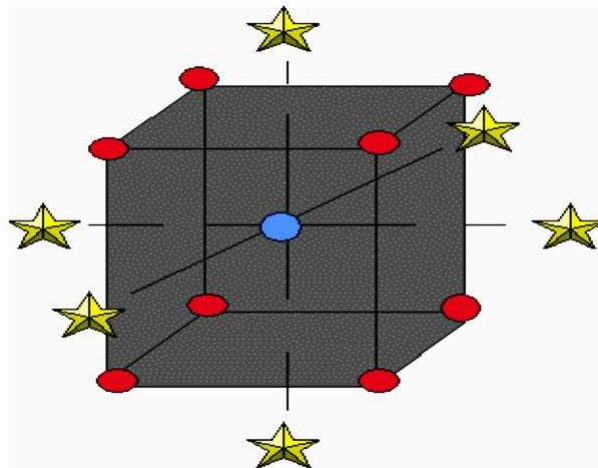
Le paramètre opératoire qui a une influence sur l'expérience ou le système est connu sous le nom de facteur. La grandeur mesurée suite à une expérience donnée est nommée réponse. Ainsi, un facteur variant dans l'intervalle [Min ; Max] sera codé à 5 niveaux : $-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$. Le plan composite centré est donc composé de 3 parties (Figure 2-25):

- Le point au centre du domaine expérimental, usuellement noté par 0. Ce point est répété plusieurs fois pour estimer la variance de répétabilité.
- Pour chaque facteur donné, on délimite un domaine de variation à deux niveaux notés -1 et $+1$
- Les points étoiles, distants de α du centre et codés $-\alpha$ et $+\alpha$. Ils sont calculés comme suit :

$$\alpha = \sqrt[4]{2^n} \quad (2.20)$$

où n étant le nombre de paramètres à étudier ($2 \leq n \leq 4$). Si $n=2$, $\alpha=1,41$; si $n=3$, $\alpha=1,6818$ et si $n \geq 4$, $\alpha=2$.

Le logiciel STATGRAPHICS Plus 4.0 for Windows est utilisé pour la réalisation des plans d'expérience et pour le traitement des résultats.



- Essais du plan factoriel (combinaisons entre les niveaux -1 et +1)
- ★ Essais étoiles (points axiaux distants de $-a$ et $+a$ du centre)
- Répétitions au centre (points au niveau $(0,0,0)$)

Figure 2-25. Plan composite centré à 3 facteurs.

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

Ce chapitre exposera les résultats et discussion sur les études effectuées sur les agrumes et les peaux d'agrumes au cours de cette thèse.

Les premiers travaux ont été effectués sur les produits entiers. Les agrumes entiers ont été traités avec les CEP pour augmenter les rendements en jus et améliorer l'extraction des polyphénols dans le jus. Ensuite, les peaux d'agrumes ont été valorisées en utilisant des technologies différentes telles que les DEHT, les IR et les US. De nouveaux solvants verts ont été proposés pour remplacer les solvants organiques. La sélectivité d'extraction de ces solvants a été étudiée par une modélisation théorique de leurs paramètres selon la méthode de Hansen. L'activité biologique des polyphénols extraits a été déterminée. La combinaison de certains traitements a permis d'intensifier l'extraction des molécules bioactives. Les cinétiques d'extraction des biomolécules ont été modélisées.

Ce chapitre est divisé en deux parties. La première partie exposera les différentes électrotechnologies utilisées dans les procédés d'extraction et la deuxième partie est dédiée à l'extraction avec les infrarouges. Pour chaque étude, les résultats seront exposés sous forme d'un article rédigé en langue anglaise. Un résumé contenant les principaux résultats, sera présenté avant chaque article.

3.1. Augmentation des rendements en jus d'agrumes et extraction des molécules bioactives à partir des peaux d'agrumes par des technologies électriques

Les technologies électriques telles que les CEP et les DEHT ont été utilisées dans les procédés d'extraction. Dans une première étude, l'effet du traitement des agrumes entiers par les CEP sur les rendements et la qualité du jus a été étudié. On s'est intéressé à caractériser la perméabilisation des membranes cellulaires par la mesure de la conductivité électrique et par des analyses microscopique, acoustique et rhéologique. L'efficacité de l'électroporation sur les deux parties des peaux (flavédo et albédo) a été déterminée pour les différents types d'agrumes. L'effet de l'intensité des CEP a été mis en valeur en traitant uniquement les peaux à une intensité élevée pour améliorer l'extraction des polyphénols.

Afin d'intensifier l'extraction des biomolécules à partir des peaux d'agrumes, les DEHT ont été appliqués. L'ensemble des phénomènes générés durant ce traitement électrique conduisent à la fragmentation de la matière première, ce qui permet une extraction rapide des biomolécules. Cette partie couvre deux études. La première étude se base sur le principe de l'extraction verte. Ce principe repose sur l'utilisation de technologies permettant de réduire la consommation d'énergie, et des solvants verts alternatifs aux solvants organiques. La deuxième étude est dédiée à la combinaison du traitement électrique avec l'hydrolyse enzymatique. L'objectif est de déterminer la chronologie la plus efficace de ces deux procédés, afin d'améliorer les cinétiques et les rendements d'extraction des polyphénols et des sucres fermentescibles à partir des peaux d'agrumes. Dans les deux études, la cinétique d'extraction des biomolécules est modélisée suivant la loi de Fick.

3.1.1. Traitement des agrumes entiers par les champs électriques pulsés : amélioration de l'extraction du jus et des polyphénols

L'objectif du traitement des agrumes entiers par les CEP avant pressage est l'augmentation des rendements en jus et l'amélioration de la qualité nutritionnelle du jus. L'endommagement des membranes cellulaires induit par le phénomène de l'électroporation durant le traitement électrique est caractérisé.

Suite à cette étude, l'article intitulé « Pulsed electric field treatment of citrus fruits: Improvement of juice and polyphenols extraction » a été publié dans le journal « Innovative Food Science and Emerging Technologies » en 2017.

3.1.1.1. Résumé de l'article

Les agrumes entiers (orange, citron, pomelo) sont traités avec les CEP à une intensité de 3 kV/cm. Le nombre d'impulsions durant le traitement avec les CEP est varié. Plusieurs méthodes sont utilisées pour caractériser l'endommagement induit par les CEP. Les indices de désintégration acoustique Z_a , de texturométrie Z_f et de conductivité électrique Z_c sont ensuite calculés.

Les valeurs maximales de Z_a qui correspondent à la même énergie de traitement par unité de masse du fruit étaient de 0,94 ; 0,93 et 0,84 pour l'orange, le pomelo et le citron, respectivement. La même tendance est observée pour les indices Z_f et Z_c . Le traitement des agrumes entiers avec les CEP a donc permis de modifier les propriétés viscoélastiques du tissu (Z_a), d'augmenter le processus de transfert d'humidité dans les structures cellulaires (Z_c) et de changer les propriétés

mécaniques du fruit (Z_f). Ce traitement a augmenté les rendements en jus obtenus après pressage de 25% pour l'orange, 37% pour le pomelo et 59% pour le citron. Les CEP ont aussi amélioré la libération des polyphénols dans le jus, d'environ 39% pour l'orange, 66% pour le pomelo et 135% pour le citron. L'augmentation du rendement en jus et de la qualité nutritionnelle du jus est expliquée par l'électroporation des cellules durant le traitement électrique.

Pour savoir sur quelle partie des peaux d'agrumes (favédo ou albédo) agit les CEP, les polyphénols ont été quantifiés et caractérisés séparément dans le flavédo et l'albédo des agrumes intacts ou traités. Pour chaque fruit intact ou traité, le flavédo et l'albédo sont séparés, broyés et une extraction des polyphénols dans 50% éthanol-eau est effectuée. Pour tous les fruits, après le traitement avec les CEP, la concentration en polyphénols reste pratiquement la même dans le flavédo et augmente légèrement dans l'albédo. Les résultats de l'HPLC ont montré que l'hespéridine est le flavonoïde majoritaire dans les peaux d'oranges, la naringine dans les peaux de pomelos et l'ériocitrine dans les peaux de citrons. Les résultats de la microscopie électronique ont montré que les cellules de l'albédo sont plus larges que celles du flavédo. L'efficacité de l'électroporation est proportionnelle à la taille des cellules, ce qui explique l'effet des CEP sur l'albédo des peaux d'agrumes.

La dernière partie de ce travail a consisté en un traitement des peaux d'oranges (flavédo et albédo) avec les CEP, dans l'eau, à une intensité de 10 kV/cm suivi d'une diffusion dans 50% éthanol-eau. Les rendements en polyphénols ont augmenté de 1,2 g/100 g MS (sans traitement) jusqu'à 2,2 g/100 g MS (avec les CEP) après 1 h d'extraction dans le mélange hydroéthanolique. Il est intéressant que ce rendement obtenu est supérieur à celui obtenu avec les peaux issues du fruit entier traité avec les CEP (1,4 g/100 g MS). Ceci montre l'impact de l'intensité du champ électrique sur l'efficacité de l'extraction.

Ce travail a montré l'efficacité du traitement des agrumes entiers avec les CEP, sur l'augmentation des rendements en jus et de son contenu en polyphénols. Le traitement des peaux d'oranges à une intensité élevée du champ électrique a amélioré l'extraction des polyphénols. Ceci permet d'une part de valoriser les peaux d'agrumes et d'autre part, d'enrichir le jus obtenu en polyphénols.

3.1.1.2. Article: Pulsed electric field treatment of citrus fruits: Improvement of juice and polyphenols extraction

(Voir le manuscrit qui suit)



Pulsed electric field treatment of citrus fruits: Improvement of juice and polyphenols extraction

Sally El Kantar^{a,c,*}, Nadia Boussetta^a, Nikolai Lebovka^{a,d}, Felix Foucart^b, Hiba N. Rajha^{a,c}, Richard G. Maroun^c, Nicolas Louka^c, Eugene Vorobiev^a

^a Sorbonne Universités, Université de Technologie de Compiègne, Laboratoire de Transformations Intégrées de la Matière Renouvelable, EA 4297, Centre de Recherches de Royallieu, BP 20529, 60205 Compiègne Cedex, France

^b Sorbonne Universités, Université de Technologie de Compiègne, Laboratoire Roberval, Centre de Recherches de Royallieu, BP 20529, 60205 Compiègne Cedex, France

^c Centre d'Analyses et de Recherche, Unité de Recherche Technologies et Valorisation Agro-alimentaire, Faculté des Sciences, Université Saint-Joseph, B.P. 17-5208 Riad El Solh, Beirut 1104 2020, Lebanon

^d Institute of Biocolloidal Chemistry named after F. D. Ovcharenko, NAS of Ukraine, 42, blvr. Vernadskogo, Kyiv 03142, Ukraine

ARTICLE INFO

Keywords:

Pulsed electric fields
Ethanol extraction
Disintegration indexes
Polyphenols
Citrus fruits

ABSTRACT

The impact of pulsed electric field (PEF) treatment on orange, pomelo, and lemon in aqueous media was studied. Whole fruits and stack of peels were PEF treated at electric field strength of 3 kV/cm and 10 kV/cm, respectively. The PEF induced damage of the whole fruit was evaluated by different disintegration indexes. The PEF treatment increased the yield of juice obtained after pressing by 25% for orange, 37% for pomelo, and 59% for lemon. The effect of PEF on different parts of each fruit was studied. Flavedo and albedo were separated from the untreated fruit or PEF treated fruit and solvent extraction (1/1 ethanol/water solution) of polyphenols was conducted. The quantification and characterization of polyphenols in each part was compared for untreated and PEF treated fruit. The application of high electric field strength on orange peels enhanced the extraction of polyphenols up to 22 mg GAE/g DM.

Industrial relevance: Citrus fruits are valuable sources of bioactive compounds (vitamins, antioxidants, carotenoids and flavonoids) and their processing represents an industrial importance. An application of PEF to whole fruits may be useful for improving the efficiency of juice extraction from different citrus fruits. The concentration of polyphenols in the extracted juice could be significantly enhanced by the treatment of citrus peels with PEF at high electric field strength.

1. Introduction

Various citrus fruits and juices are highly consumed worldwide. For example, global orange and lemon productions for 2016/17 are forecast up 2.4 and 7.3 million metric tons, respectively (Putnik et al., 2017). The citrus fruits are rich in antioxidant bioactive compounds such as vitamin C, carotenoids, and polyphenols like flavanones (major group), flavones and flavonols and they have been associated in the prevention of different diseases such as cancer (Abad-García et al., 2014; Cancalon, 2016; Khan, Dangles, et al., 2014; Rampersaud & Valim, 2017; Tanaka, Tanaka, Tanaka, & Kuno, 2011; Yi, Ma, & Ren, 2017).

For citrus fruits, large amounts of peels are usually discarded as residues of the citrus juice production (Mirabella, Castellani, & Sala, 2014). Citrus peels are a rich source of soluble sugars, polyphenols,

flavonoids, essential oils, dietary fibers (cellulose, hemicelluloses, pectin) and vitamins and they can be used for the production of low-cost nutritional dietary supplements (Putnik et al., 2017; Rafiq et al., 2016; Tripoli, La Guardia, Giammanco, Di Majo, & Giammanco, 2007; Yi et al., 2017).

Several innovative alternative methods were recently tested (green solvents, supercritical CO₂, pressurized fluid extraction, high-pressure assisted extraction, pulsed electric fields (PEF), ultrasounds, micro-waves, anaerobic digestion and enzyme assisted extraction) to extract bio-active compounds from citrus peels (M'hiri, Ioannou, Ghoul, & Boudhrioua, 2014; M'hiri, Ioannou, Ghoul, & Mihoubi Boudhrioua, 2017; Putnik et al., 2017). The potential of PEF as a gentle technology to assist the extraction efficiency from different food plants is widely recognized (Barba et al., 2015; Barba, Galanakis, Esteve, Frigola, & Vorobiev, 2015; Donsi, Ferrari, Maresca, & Pataro, 2011; Jaeger,

* Corresponding author at: Sorbonne Universités, Université de Technologie de Compiègne, Laboratoire de Transformations Intégrées de la Matière Renouvelable, EA 4297, Centre de Recherches de Royallieu, BP 20529, 60205 Compiègne Cedex, France.

E-mail address: sally.el-kantar@utc.fr (S. El Kantar).

<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.09.024>

Received 3 July 2017; Received in revised form 18 September 2017; Accepted 23 September 2017

Available online 24 October 2017

1466-8564/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Reineke, Schoessler, & Knorr, 2012; Parniakov, Barba, Grimi, Lebovka, & Vorobiev, 2014, 2016; Puértolas & Barba, 2016; Vorobiev & Lebovka, 2011). PEF can provoke the electroporation of cell membranes without undesirable changes in plant foods. The reviews on application of PEF in biorecovery operations of residues and wastes of different biomasses (exotic fruits, grapes, lignocellulosic, and oil crop components) have been recently issued (Barba, Parniakov, Koubaa, & Lebovka, 2017; Frey et al., 2016; Miklavcic, 2017; Vorobiev & Lebovka, 2016). Previous experiments have demonstrated that PEF was effective for the extraction of polyphenols from vine shoots (Rajha, Boussetta, Louka, Maroun, & Vorobiev, 2014) and grape seeds (Boussetta, Lesaint, & Vorobiev, 2013). The non-thermal nature and low energy consumption are the main advantages of PEF-assisted extraction of juice as compared to the conventional pretreatments techniques (grinding, heating, addition of chemicals and enzymes). It has been shown that PEF pretreatment of whole fruits such as apples, grapes, carrots and blueberries, before mechanical pressing, increased the yield and quality of extracted juices (Bobinaite et al., 2014; Grimi, Mamouni, Lebovka, Vorobiev, & Vaxelaire, 2011; Jaeger, Schulz, Lu, & Knorr, 2012; Praporscic, Lebovka, Vorobiev, & Mietton-Peuchot, 2007). It can be also expected that PEF pretreatment can result in softening of products and allow reducing the energy consumption during pressing. However, the PEF assisted processing of citrus fruits was rarely discussed in the literature. The impact of the PEF treatment (at the electric field strength of $E = 1\text{--}7$ kV/cm, the pulse duration of $t_i = 3$ μs , and the number of pulses of $n = 5\text{--}50$) of fresh orange peels on the extraction by pressing (30 min at 5 bars) of total polyphenols and flavonoids was recently discussed (Luengo, Álvarez, & Raso, 2013). It was demonstrated that PEF treatment noticeably increased the quantity of polyphenols and their antioxidant activity.

This work is devoted to study the effects of PEF treatment of whole citrus fruits (orange, pomelo and lemon) on the extraction efficiency and quality of juices as well as the effect of PEF treatment of peels on the ethanol extraction of polyphenols. The dependence of juice yield and content of polyphenols versus the number of pulses was investigated. The effects of PEF treatment of orange peels (flavedo and albedo) on the extraction of polyphenols at different ethanol concentration were also studied.

2. Materials and methods

2.1. Citrus fruits

Commercial orange, pomelo and lemon fruits with good, uniform quality and approximately the same size were purchased at a local supermarket (Compiègne, France) and stocked at 4 °C until use. In total 5 batches were used to complete all the necessary experiments. The moisture content, measured by drying 25 g of the fresh fruit tissues at 105 °C to constant weight, was about 87 wt%, 90 wt% and 92 wt% for orange, pomelo and lemon pulps, respectively. The moisture content in peels was approximately 10% lower than that in the pulps.

2.2. Experimental methods

The general scheme of experiments is shown in Fig. 1a. The whole fruits were initially pre-treated by PEF (at 3 kV/cm). The PEF-induced damage in the cells of the whole fruits was analysed using electrical conductivity, acoustic, and cutting force measurements. After PEF treatment, the fruits were cut, pressed, and the obtained juice, residue and peels were analysed. The effects of PEF on different parts of each fruit were studied by the extraction and the characterization of polyphenols from the flavedo and the albedo of each fruit. The flavedo and albedo were separated from untreated and PEF treated fruit. After grinding each fresh (non-dried) part separately, a solvent extraction in 50% ethanol-water solution was done for 1 h at 50 °C. The solvent extraction was also conducted in 0%, 25% and 50% ethanol-water

solutions for 1 h at 50 °C for stack of orange peels (flavedo + albedo) treated with PEF. Preliminary experiments showed that ethanol concentration of 50% is optimal and further increase ethanol content up to 75% gave similar polyphenol yields as at 50%. Moreover, at concentration higher than 75% the polyphenol yields decreased. Therefore, an intermediate (optimal) solvent polarity, can give the highest polyphenol extraction. Polyphenols were characterized in the albedo and the flavedo of the untreated and PEF treated whole fruit by HPLC.

Application of PEF treatment was also tested for the valorisation of citrus peels. Stack of orange peels (flavedo and albedo) were pre-treated with PEF (at 10 kV/cm), then polyphenols extraction was done in 50% ethanol-water for 1 h.

2.2.1. PEF treatment

The whole fruit or stack of peels (flavedo: peripheral surface) and albedo (white soft middle layer) were placed in the Teflon cylindrical treatment chamber (Atelier Génie des Procédés Industriels, UTC, France) filled with tap water between two plane electrodes (Fig. 1b). The electrodes with diameter of 105 mm were made of stainless steel. The distance between the electrodes d was 12 cm for the treatment of the whole fruit and 4 cm for the treatment of the orange peels. The chamber was connected to the pulsed electric power Marx generator that provided the maximum voltage U of 40 kV and current of 10 kA. The time interval between pulses was $\Delta t = 2$ s. Equivalent electric field strength was estimated as $E = U/d$. It was $E = 3$ kV/cm for treatment of whole fruits and $E = 10$ kV/cm treatment of stacks of skins.

Fig. 2a shows the example of pulse protocol with exponential decay pulses. The pulse duration was about $t_i = 70$ μs and n pulses were applied successively. The chosen protocol of successive pulses allowed fine control of the plant tissue permeabilization without any significant temperature elevation ΔT during the PEF treatment (Fig. 2b). The temperature was recorded inside the geometrical centre of sample using a teflon-coated thermocouple Thermocoax type 2 (AB 25 NN). The value of ΔT was nearly proportional to the number of pulses n . The specific energy per pulse can be evaluated as $\Delta W = C\Delta T \approx 0.16$ kJ/kg, where $C \approx 3.91$ kJ/kg °C is a specific heat capacity of orange fruit (Ikegwu, Ekwu, et al., 2009). The similar values of ΔW were estimated for other citrus fruits.

For the characterization of PEF-induced damage in the cells of the whole fruits, different approaches were applied (Miklavcic, 2017). The electrical conductivity disintegration index Z_c was estimated by measurement of the electrical conductivity σ using a multimeter 819 (Instek, 12–100 kHz). In measurements, the two needle-like electrodes (with a surface of 30 mm²) inserted into the central part of the whole fruit were used. The distance between the electrodes was ≈ 40 mm. The acoustic disintegration index Z_a was estimated using Aweta acoustic firmness sensor (Aweta DFT, Version 0.0.0.7., Nootdorp, Netherlands) (Grimi, Mamouni, Lebovka, Vorobiev, & Vaxelaire, 2010). The sensor was placed on the surface of a fruit. After a series of gentle taps with a small hammer, the fruit resonated at a certain frequency f . The signal was captured and modified by a Fourier transform method. The index of firmness F was defined as $f^2 m^{2/3} \rho^{1/3}$ (Grimi et al., 2010) where m and ρ are the mass and density of the sample. The cutting force disintegration index Z_f was evaluated using force cutting test (Fig. 3). The force required for cutting the fruit f^c was measured by a texturometer TA-XT plus (Rhéo, Champlan, France) equipped with a cutting blade. During this test, a displacement speed of 1 mm/s was applied.

2.2.2. Evaluation of disintegration indexes

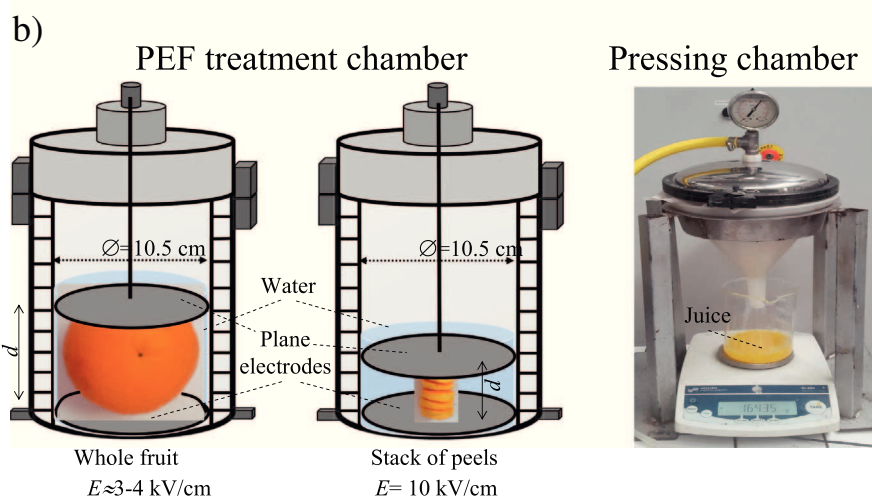
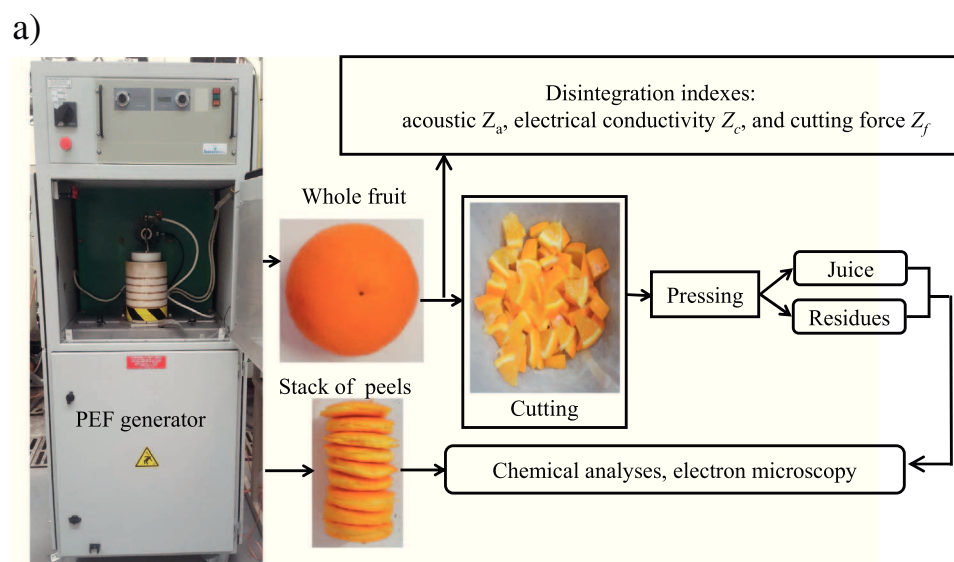
The values of Z_c , Z_a , and Z_f were calculated as (N. I. Lebovka, Bazhal, & Vorobiev, 2002; Miklavcic, 2017)

$$Z_c = (\sigma - \sigma_i) / \sigma_d - \sigma_i \quad (1.1)$$

$$Z_a = (F - F_i) / (F_d - F_i) \quad (1.2)$$

$$Z_f = (f^c - f_i^c) / (f_d^c - f_i^c) \quad (1.3)$$

Fig. 1. The general scheme of experiments (a) and treatment chambers applied in the present experiments (b).



where subscripts i and d refer to the measured values of the untreated (intact) and completely damaged fruits, respectively. All values were measured at the same temperature, $T = 20$ °C and the completely damaged materials were obtained using the freezing/thawing procedure. Application of the above equations gives $Z = 0$ for the untreated and $Z = 1$ for completely damaged fruits.

2.2.3. Expression of juice

The samples were manually cut into the similar slices (cubes with linear dimensions of ≈ 0.5 cm). A laboratory compression chamber (Sofralab, France) was used for the extraction of juice (Fig. 1b). The slices were put in a hemispherical compartment. A constant pressure of 4 bars was applied from air compressor to fruit slices through an elastic diaphragm for 30 min. The juice yield was calculated as follows:

$$Y(\%) = 100M/M_i \quad (2)$$

where M is the mass of the obtained juice and M_i is the initial mass of the fruit before pressing.

2.2.4. Electron microscopy of peels

To study the effect of PEF treatment on the cells of the peels of orange, pomelo and lemon, a rectangular piece of peel (flavedo + albedo) was separated from untreated and PEF treated whole fruit. The

morphology and organization of the cells were investigated by scanning electron microscopy. The images were obtained using an electron scanning microscope QUANTA 250 FEG (FEI Company, Oregon, USA) at magnification of $50\times$. In each experiment, 15 images from three different samples were analysed for untreated and PEF treated citrus peels.

2.3. Analysis of polyphenols content

2.3.1. Folin-Ciocalteu method

The amount of total polyphenol content was determined in juice obtained after pressing of untreated and PEF treated whole fruits, and in ethanol extracts from albedo and flavedo of each fruit, and from stack of orange peels (albedo + flavedo), using the Folin-Ciocalteu colorimetric method. 1 mL of ten-fold diluted Folin-Ciocalteu reagent (Merck, Darmstadt, Germany) was added to 0.2 mL of the extract. Then 0.8 mL of sodium carbonate (Na_2CO_3) (75 g/L) (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France) was added. The mixture was incubated at 60 °C for 10 min. After cooling at room temperature, the absorbance was measured at 750 nm by the UV-Vis spectrophotometer (Thermo Spectronic Genesys 20, Thermo Electron Corporation, MA, USA). Gallic acid (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) was used for the calibration curve. The amount of polyphenols was expressed as mg of gallic

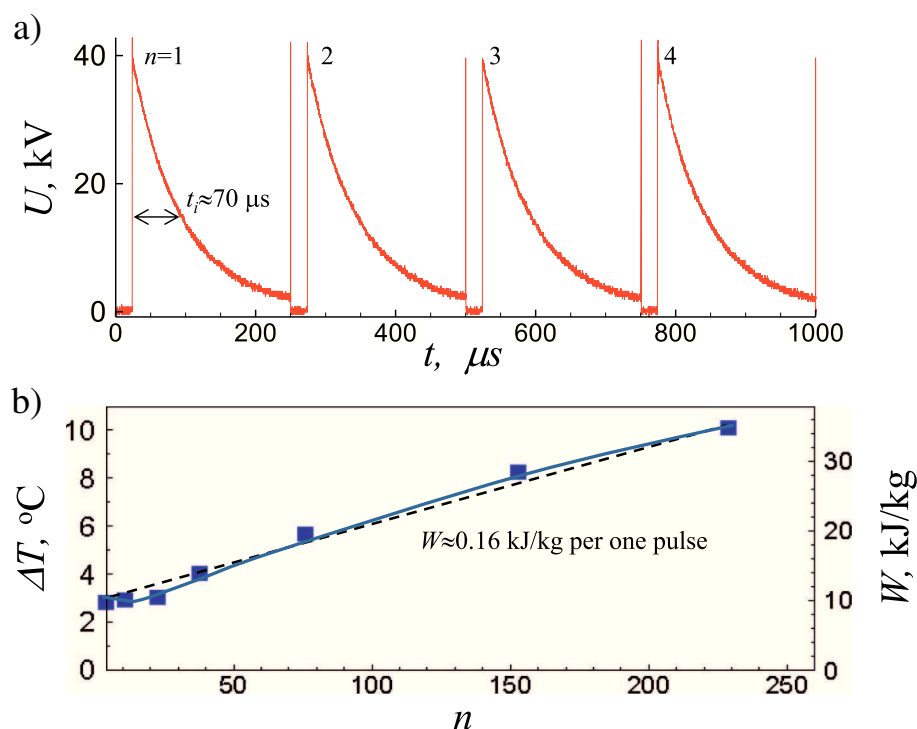


Fig. 2. Example of pulse protocol with exponential decay pulses during PEF treatment of orange whole fruit (a) and temperature/specific energy increase ($\Delta T/W$) versus number of pulses n (b). Here, $t_i \approx 70 \mu\text{s}$ is pulse duration (a) and the dashed line corresponds to a slope of 0.16 kJ/kg per one pulse (b).

acid equivalent (GAE) per gram of dry matter (mg GAE/g DM) for the extracts of peels and in mg of GAE per 100 mL of juice (mg GAE/100 mL) for the obtained juice after pressing.

2.3.2. High performance liquid chromatography analyses

The polyphenol contents have been analysed using the previously described procedure (Luengo et al., 2013). Hesperidin, naringin and eriocitrin (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) were used as standards in high performance liquid chromatography (HPLC) analyses. Ultimate 3000 (Dionex, Idtsein, Germany) liquid chromatography apparatus coupled to a diode array detector was used. Prior analyses, the samples and standards were filtered through $0.2 \mu\text{m}$ syringe filters

(VWR, France). The chromatography column C18 capillary column $100 \times 4.6 \text{ mm}$ (Hypersil Gold, Thermo Scientific, USA), was used for all experiments. The temperature of the column was maintained at 40°C . Water-formic acid solution (95:5) (solvent A) and acetonitrile (solvent B) (HPLC grade, Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) were used as solvents. A flow rate of 1 mL/min was applied. The HPLC applied method was as follows: 2%–6% of solvent B in 25 min, 6%–15% of solvent B in 15 min, 15%–20% of solvent B in 12 min and 20%–40% of solvent B in 18 min. The injection volume of the sample was $20 \mu\text{L}$. Chromatograms were recorded using the photodiode array detector at 280 nm . Two HPLC analyses were conducted for each sample. The flavonoid was identified according to its retention time in comparison

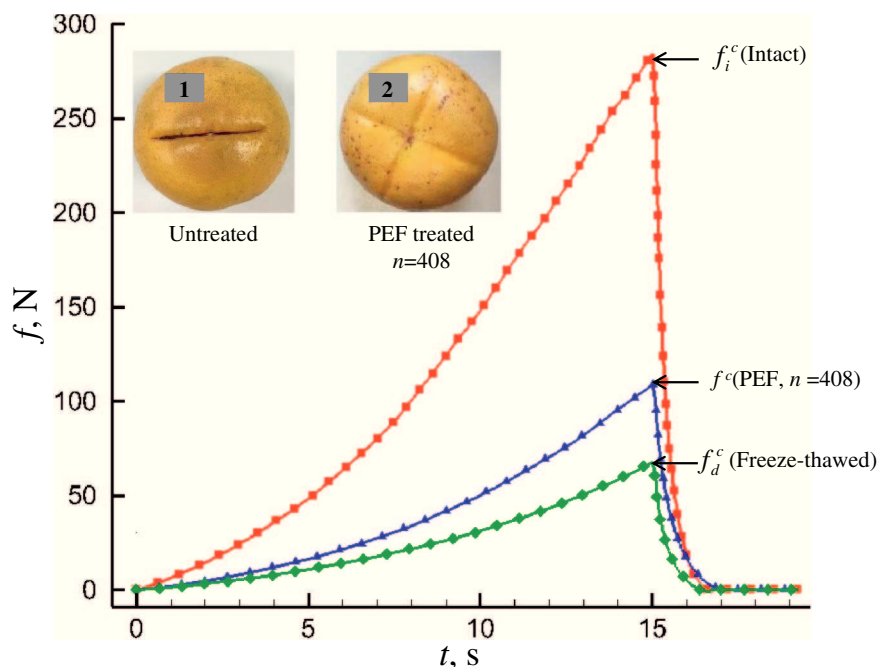


Fig. 3. Example of a force f versus the time t for the cutting tests of pomelo whole fruit. PEF treatment was done using $n = 408$ pulses. Here, f_i^c , f_e^c , and f_d^c are the cutting forces for the untreated, PEF treated and freeze-thawed fruits, respectively. To compare the different untreated and PEF treated products, the force f was obtained after a same displacement of the blade of 30 mm in the fruit.

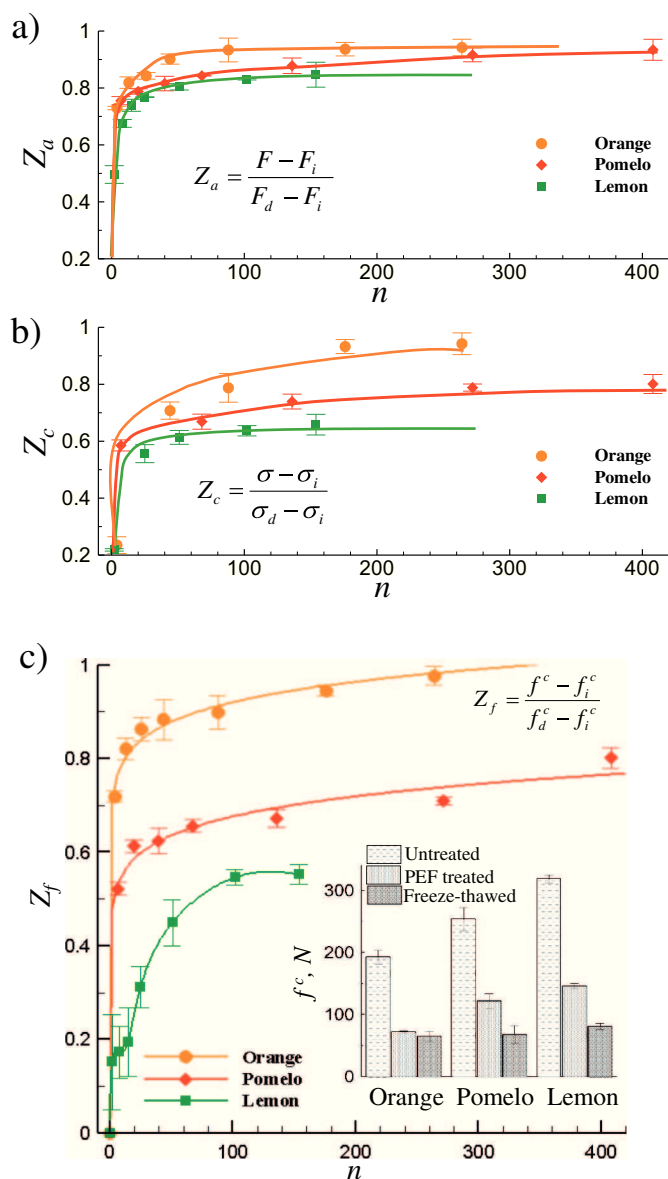


Fig. 4. Acoustic Z_a (a), electrical conductivity Z_c (b) and cutting force Z_f (c) disintegration indexes versus number of pulses n applied during PEF treatment. Insert in (c) shows the force needed to cut the untreated, PEF treated ($n = 176$ for orange, $n = 272$ for pomelo, and $n = 102$ for lemon) and completely damaged (freeze-thawed) fruits.

to the commercial standard. Quantification was completed using the external standard method: a linear regression of the peak area vs. concentration (0.03 to 1 mg/mL) was used and the final concentrations were expressed in mg per g dry matter (mg/g DM).

2.4. Statistical analysis

All experiments and measurements of characteristics were repeated using, at least, five replicates. The mean values and the standard deviations were calculated. The error bars in all the figures correspond to the confidence level 95%.

3. Results and discussions

3.1. Juice yield and polyphenols content in juice

Fig. 4 presents the disintegration indexes Z_a , Z_c and Z_f as a function of the number of pulses applied during PEF treatment of whole fruits at

$E = 3$ kV/cm. The observed data show that PEF damage efficiency depends on the number of pulses applied and is variable between citrus fruits.

The acoustic response of the fruits depends on their elastic properties, their mass and their shape (García-Ramos, Valero, Homer, Ortiz-Cañavate, & Ruiz-Altisent, 2005). Acoustic properties may depend on the internal structure organization of the fruit, the size and the distribution of the cells in it and the cell wall thickness (Chanvrier, Jakubczyk, Gondek, & Gumy, 2014). The modification in acoustic properties during PEF treatment could be explained by the loss of the native turgor and the change in the viscoelastic properties of the plant tissue induced by the phenomenon of electroporation (Wiktor et al., 2015). The different changes in acoustic properties for orange, pomelo and lemon were observed (Fig. 4a). For example, at the same number of pulses, the values of Z_a were highest for the orange and lowest for the lemon. The maximum (near saturation) values of Z_a that correspond to the same energy input per mass unit, were ≈ 0.94 , 0.93 and 0.84 for orange, pomelo and lemon, respectively.

Similar tendencies in the behavior of other disintegration indexes were observed. Electrical conductivity disintegration index (Fig. 4b) can reflect the effect of PEF treatment on cell permeabilization through the development of electroporation, resealing and moisture transfer processes inside the cellular structures (Grimi et al., 2010; Lebovka, Bazhal, & Vorobiev, 2001). The value of Z_c increases with the number of pulses applied during PEF treatment. Similar results were also observed on mango peels (Parniakov et al., 2016), papaya peels (Parniakov et al., 2014) and blackberries (Barba, Galanakis, Esteve, Frigola, & Vorobiev, 2015), where PEF treatment electrically induced damage on cell membranes by the phenomenon of electroporation, which enhanced the extraction of intracellular components through the diffusion process.

The cutting force disintegration index Z_f reflects changes in the mechanical properties of fruits. Insert in Fig. 4c shows that PEF treatment reduced the force needed to cut the fruit from 193 N to 72 N for orange ($n = 176$), from 254 N to 122 N for pomelo ($n = 272$) and from 319 N to 146 N for lemon ($n = 102$). The untreated orange required the lowest force to cut it, followed by pomelo and lemon. Similar tendencies in the decrease of the cutting forces for all studied fruits can reflect the changes in the softness of the fruit skins, the induced damage of cells, and the loss in the native turgor. As shown in Fig. 3, for the same displacement of the blade in the fruit, the untreated pomelo was cut, while the PEF treated pomelo was not cut. The same appearance was observed for the orange and the lemon. This is explained by the fact that the product becomes softer and will be able to deform without being cut. Thus, the resistance of the pomelo to the displacement of the blade is lower, and the values of f^c and f_d^c were respectively 105 N and 68 N.

The juice expression experiments for untreated fruits, gave the final juice yield 48% for orange, 54% for pomelo and 39% for lemon (Fig. 5a). For the PEF-treated whole fruits, the yields of juice increased up to 60% for orange, 74% for pomelo and 63% for lemon. The increase in relative juice yields $Y/Y_i - 1$ was $\approx 25\%$ for orange, 37% for pomelo and 59% for lemon (Fig. 6a). Therefore, the application of PEF on citrus fruits is an effective tool for juice yield improvement. The similar improvements of juice expression were previously demonstrated for different other fruits. The juice yield increased up to 44% for grapes (Praporscic et al., 2007), 32% for blueberries (Bobinaite et al., 2014), and 23% for carrots (Jaeger et al., 2012). PEF treatment of grapes before expression was more effective than intermediate PEF treatment and resulted in higher juice yield (Praporscic et al., 2007). However, PEF treatment of blueberries at relatively high field strength up to 5 kV/cm decreased the juice yield obtained after pressing that was explained by unfavorable de-juicing conditions (Bobinaite et al., 2014).

Fig. 5b presents the yields of polyphenols presented in juice after pressing of untreated fruits. They were 69, 80 and 58 mg GAE/100 mL (hereinafter mg/100 mL) in juices of orange, pomelo and lemon, respectively. These yields of polyphenols in juice are comparable with

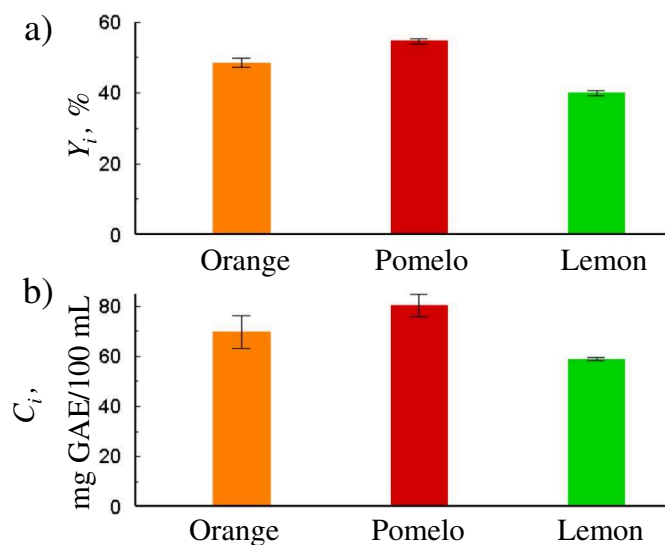


Fig. 5. Yields of juice Y_i (a) and polyphenols concentrations C_i (b) in the juice obtained after pressing of untreated fruits.

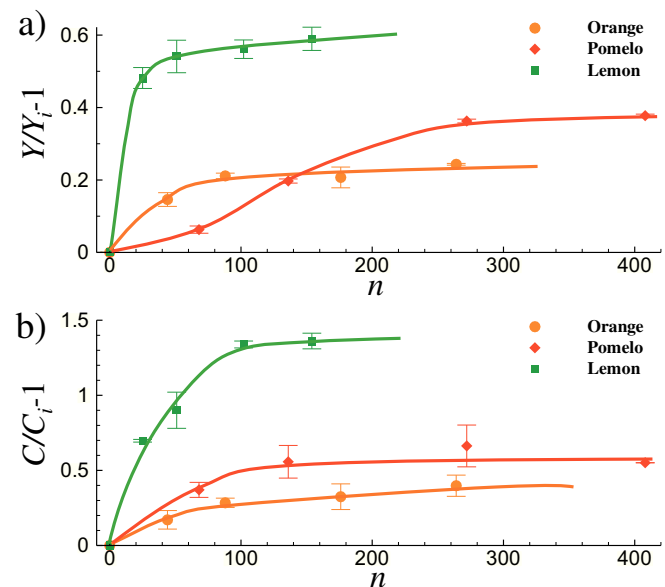


Fig. 6. The increase in relative juice yields $Y/Y_i - 1$ (a) and polyphenols concentration $C/C_i - 1$ (b) in the juice obtained after pressing of PEF treated fruits. Here, Y_i and C_i are the juice yield and polyphenols concentration for the untreated fruits.

those obtained in orange juice (43 mg/100 mL) (Guerrouj, Sánchez-Rubio, Taboada-Rodríguez, Cava-Roda, & Marín-Iniesta, 2016), in pomelo juice (between 63 and 150 mg/100 mL) (Pichaiyongvongdee & Haruenkit, 2009) and in lemon juice (63 mg/100 mL) (Gironés-Vilaplana, Mena, García-Viguera, & Moreno, 2012). Moreover, PEF treatment improved the polyphenol contents and nutritional quality of the juices. The increase in the release of polyphenols from the inner parts of the cells into the juice was approximately 39% for orange, 66% for pomelo and 135% for lemon (Fig. 6b). Similar results were obtained on apple juice. The effect of PEF treatment of apples was remarkable. The high quality ice juice rich in bioactive compounds with large concentrations of carbohydrates and polyphenols was obtained from PEF pretreated apples (Carbonell-capella et al., 2016).

The observed increase of juice yield Y and polyphenols concentration C can be naturally explained by the electroporation of cells provoked by PEF treatment before pressing (Fig. 6). It is interesting to note that at the same number of pulses n the increase in relative juice yield

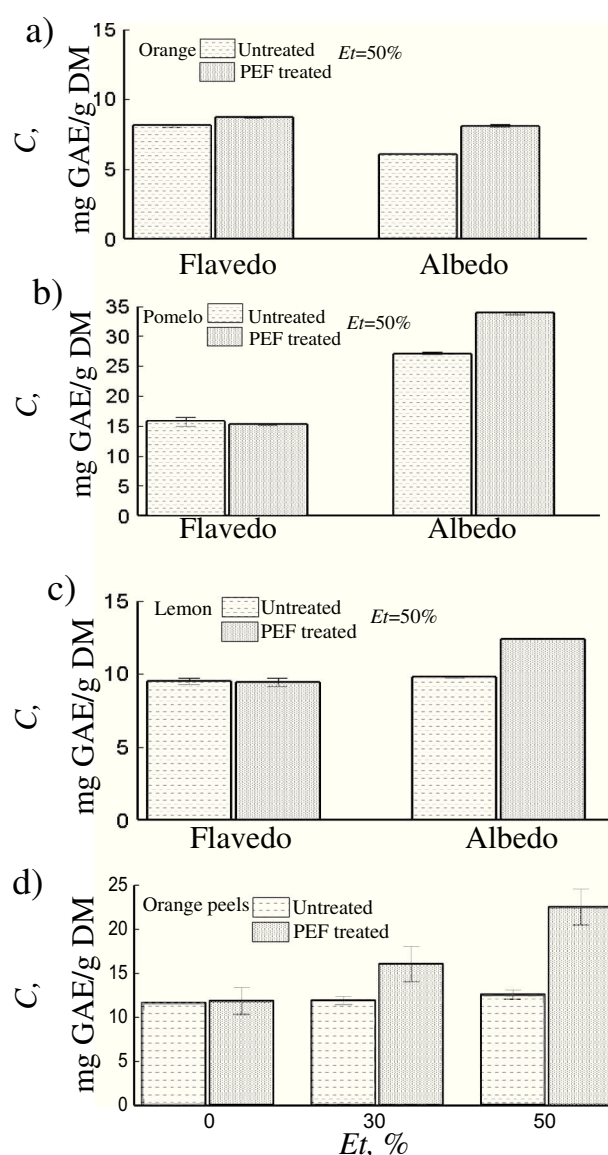


Fig. 7. Concentration of polyphenols C in albedo and flavedo of orange (a), pomelo (b) and lemon (c) peels for the untreated and PEF treated whole fruits. PEF treatment was done at $E = 3$ kV/cm ($n = 176$, orange, $n = 272$, pomelo, and $n = 102$, lemon), followed expression and then 50% ethanol-water extraction was done. Polyphenols concentration in albedo + flavedo of orange peels for untreated and PEF treated stacks of orange peels (d). PEF treatment was done at $E = 10$ kV/cm, $n = 100$ and followed by ethanol-water extraction at different ethanol concentration E_t .

$Y/Y_i - 1$ and polyphenols concentration $C/C_i - 1$ was the highest for the lemon fruit and lowest for the orange fruit. The inverted tendency was observed in behavior of disintegration indexes presented in Fig. 4, where all the disintegration indexes are highest for the orange and lowest for the lemon. Such inconsistency is still unclear and it can be explained by the different drainage (structure permeability) properties of each fruit.

However, in all experiments with PEF treatment of the whole fruits at $E = 3$ kV/cm the highest (near saturation) values of disintegration indexes (Fig. 4) as well as juice and polyphenol yields (Fig. 6) were observed at $n = 176$ for orange, $n = 272$ for pomelo, and $n = 102$ for lemon. For these protocols, the energy consumptions were in the interval ≈ 16 –44 kJ/kg and they were used in other reported experiments for PEF treated whole fruits.

Note that performed laboratory tests used the oversimplified compression chamber and do not allow translating the obtained results to

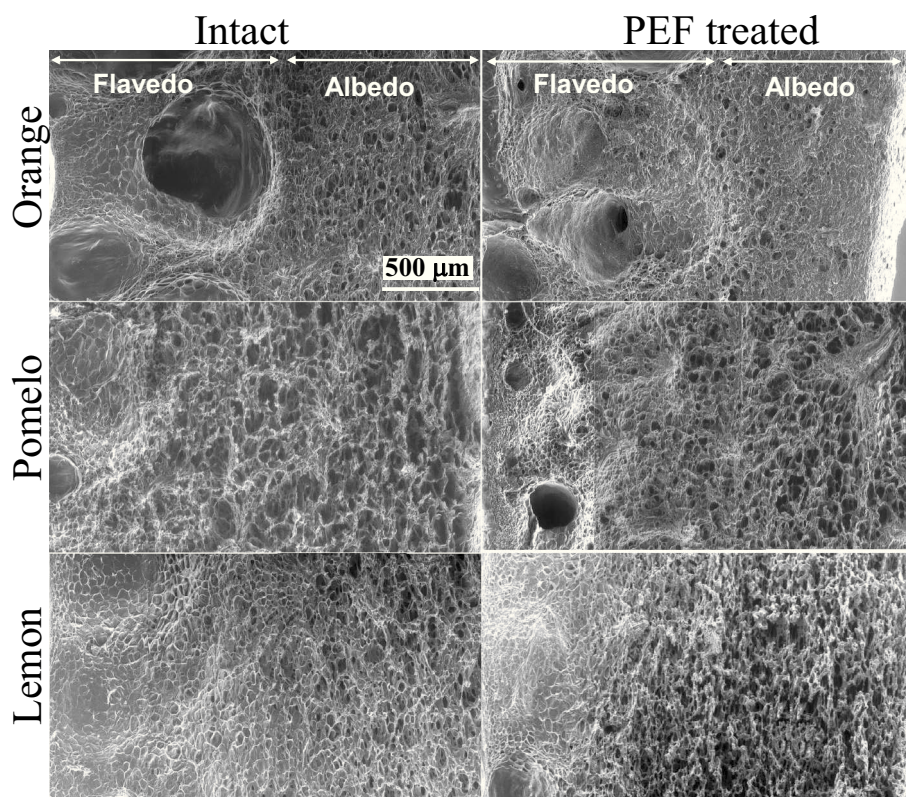


Fig. 8. Electron microscopy analysis for the untreated and PEF treated citrus peels (albedo and flavedo).

Table 1

Major flavonoids in orange, pomelo and lemon peels for untreated and PEF treated whole fruits. The electric field strength was $E = 3 \text{ kV/cm}$, and the number of pulses corresponded to the highest level of PEF induced damage, $n = 176$ for orange, $n = 272$ for pomelo, and $n = 102$ for lemon. The mean values and the standard deviations (the confidence level of 95%) are presented.

Fruit	Flavonoids	Flavedo		Albedo	
		Untreated	PEF treated	Untreated	PEF treated
Orange	Hesperidin (mg/g DM)	4.852 ± 0.004	5.073 ± 0.003	4.811 ± 0.005	4.82 ± 0.06
Pomelo	Naringin (mg/g DM)	7.354 ± 0.003	10.366 ± 0.002	24.083 ± 0.004	26.86 ± 0.02
Lemon	Eriocitrin (mg/g DM)	3.064 ± 0.003	1.44 ± 0.01	1.730 ± 0.005	1.970 ± 0.005

the industrial scale. Industrial PEF-assisted extraction requires more thorough adaptation and optimization in dependence on applied pressing technique and sort of the product.

3.2. Polyphenols content in peels

Figs. 7a–c present concentration of polyphenols C in albedo and flavedo of orange (a), pomelo (b) and lemon (c) peels for untreated and PEF treated fruits. In the case of the untreated pomelo, the quantity of polyphenols in the albedo is higher than the flavedo. This could be explained by the fact that the density of the albedo is lower than the density of the flavedo, and consequently the volume of the albedo per unit of mass is more important. The PEF treatment was followed by expression of juice and then the peel residues were used for 50% ethanol-water extraction. For all fruits, after the PEF treatment, the concentration of polyphenols was practically unchanged in the flavedo and noticeably increased in the albedo. In the case of pomelo, the slight decrease in the concentration of polyphenols from the flavedo after PEF treatment is due to the release of polyphenols from the flavedo into the water during PEF treatment of the whole fruit.

For all tissues, data of electron microscopy did not reveal clear

difference in the structure of flavedo and albedo cells before and after the PEF treatment (Fig. 8). These results are in full correspondence with previously reported data on absence of noticeable impact of PEF on the cell walls (Vorobiev & Lebovka, 2011). No difference in the structure of potato tissue was also detected before and after PEF treatment (Ben Ammar, Lanoisellé, Lebovka, & Van Hecke, 2010). The obtained data evidenced the absence of PEF-induced cell wall disruption, changing the cell area or the shape of the starch granules. In another study on the extraction of colorants from red prickly pear peels, electron microscopy revealed pores on PEF pretreated cell surfaces (Koubaa et al., 2016). However, the structure of flavedo and albedo tissues of citrus is rather uniform, the flavedo part contains large pores, whereas the albedo cells are larger than flavedo ones. As the electroporation efficiency is proportional to the size of the cell (Vorobiev & Lebovka, 2011) we can expect the higher PEF efficiency for the albedo tissue which is in correspondence with experimental data (Fig. 7a–c).

HPLC analyses revealed that different flavonoids could dominate in content of peel extracts for tested citrus fruits. For example, hesperidin, naringin and eriocitrin dominate in the peels of orange, pomelo, and lemon fruits, respectively. Table 1 shows the contents of these flavonoids in flavedo and albedo for the untreated and PEF treated fruits.

Note that these flavonoids have different structures. They differ by their degree of hydroxylation and polymerization and other substitutions and conjugations, and their biological activities are structure dependent (Kumar & Pandey, 2013). The typical structure of each flavonoid can interact with enzyme systems included in crucial pathways, showing important pharmacological activities (Wang, Li, & Bi, 2017).

No clear correlations were observed between changes in total polyphenols contents (Fig. 7a–c) and contents of dominating flavonoids (Table 1). It may reflect selective efficiency of PEF for the recovery of different polyphenols. PEF treatment provokes the electropermeabilization of cell membranes including albedo cells and induces the selective extraction of polyphenols into the juice. Untreated cells can be resistant during pressing without releasing of their polyphenols. Note that PEF treatment has shown also to be effective for the selective extraction of polyphenols from fermented grape pomace (Brianceau, Turk, Vitrac, & Vorobiev, 2015).

The previous experiments performed at $E = 1\text{--}7$ kV/cm revealed that polyphenols extraction efficiency by pressing of fresh orange peels can be improved at high electric field strength (Luengo et al., 2013). In this work, the supplementary investigations on polyphenols recovery from fresh orange peels (flavedo + albedo) by ethanol-water extraction at different concentration of ethanol were done. The stacks of peels were treated at $E = 10$ kV/cm and $n = 100$. Though, we did not perform the detailed study on optimisation of PEF protocol since the preliminary experiments have shown that such PEF treatment is sufficient for high recovery of polyphenols. For the untreated orange peels the increase in ethanol concentration (in the diapason 0–50%) was accompanied with the increase of the polyphenol yield, but the effect was insignificant (Fig. 7d). However, for PEF treated stacks of peels, the improvement of the recovery of polyphenols with the increase in ethanol concentration was rather significant. For example, at the concentration of ethanol $E_t = 50\%$ the polyphenol yields were 12 mg GAE/g DM (hereinafter mg/g DM) and 22 mg/g DM for untreated and PEF treated stacks of orange peels, respectively. This shows a synergistic effect between PEF treatment and ethanol concentration. It is interesting that the obtained yield for PEF treated stacks of orange peels was noticeably higher than that for albedo + flavedo (16 mg/g DM) skins obtained after the PEF treatment of the whole orange at 3 kV/cm. It evidently reflects the impact of high field on extraction efficiency.

4. Conclusions

The impact of pulsed electric fields on juice expression efficiency and recovery of polyphenols from citrus fruits (orange, pomelo and lemon) was studied. The different disintegration indexes (acoustic, electrical conductivity and cutting force) allowed the characterization of PEF-induced damage and the efficiency of the electroporation. The PEF treatment at $E = 3$ kV/cm of whole fruits increased the yields of juice obtained after pressing and improved the concentration of polyphenols in juices. The PEF treatment of stacks of orange skins at $E = 10$ kV/cm gave the yield of 22 mg/g DM as compared with the yield of 16 mg/g DM for skins (for albedo + flavedo) obtained after the treatment at $E = 3$ kV/cm of whole fruits. Moreover, such treatment improved extraction of polyphenols in 50% ethanol solution from fruit skins by a synergistic effect. Therefore, the obtained data evidence the good efficiency of PEF treatment for the improvement of the expressing of juice and the recovery of polyphenols from the skins of different citrus fruits.

Acknowledgements

The authors would like to thank Parniakov, O., Adda, P. and Dr Grimi, N. for their technical assistance. The authors gratefully acknowledge Nadaud, F. who helped in doing the electron microscopy.

Funding

This work was supported by the Lebanese National Council for Scientific Research and Université de Technologie de Compiègne, France.

References

- Abad-García, B., Garmón-Lobato, S., Sánchez-Ilárduya, M. B., Berrueta, L. A., Gallo, B., Vicente, F., & Alonso-Salces, R. M. (2014). Polyphenolic contents in citrus fruit juices: Authenticity assessment. *European Food Research and Technology*, 238(5), 803–818.
- Barba, F. J., Galanakis, C. M., Esteve, M. J., Frigola, A., & Vorobiev, E. (2015). Potential use of pulsed electric technologies and ultrasounds to improve the recovery of high-added value compounds from blackberries. *Journal of Food Engineering*, 167, 38–44.
- Barba, F. J., Parniakov, O., Koubaa, M., & Lebovka, N. (2017). Pulsed electric fields assisted extraction from exotic fruit residues. In D. Miklavcic (Ed.), *Handbook of electroporation* (pp. 1–18). Cham: Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-26779-1_124-1.
- Barba, F. J., Parniakov, O., Pereira, S. A., Wiktor, A., Grimi, N., Boussetta, N., ... Vorobiev, E. (2015). Current applications and new opportunities for the use of pulsed electric fields in food science and industry. *Food Research International*, 77, 773–798.
- Ben Ammar, J., Lanoisellé, J., Lebovka, N. I., & Van Hecke, E. (2010). Effect of a pulsed electric field and osmotic treatment on freezing of potato tissue. *Food Biophysics*, 5(3), 247–254.
- Bobinaite, R., Pataro, G., Lamanuskas, N., Satkauskas, S., Viskelis, P., & Ferrari, G. (2014). Application of pulsed electric field in the production of juice and extraction of bioactive compounds from blueberry fruits and their by-products. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5898–5905.
- Boussetta, N., Lesaint, O., & Vorobiev, E. (2013). A study of mechanisms involved during the extraction of polyphenols from grape seeds by pulsed electrical discharges. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, 124–132.
- Brianceau, S., Turk, M., Vitrac, X., & Vorobiev, E. (2015). Combined densification and pulsed electric field treatment for selective polyphenols recovery from fermented grape pomace. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 29, 2–8.
- Canalón, P. F. (2016). Citrus juices health benefits. *Beverage impacts on health and nutrition* (pp. 115–127). Springer.
- Carbonell-capella, J. M., Parniakov, O., Barba, F. J., Grimi, N., Bals, O., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2016). “Ice” juice from apples obtained by pressing at subzero temperatures of apples pretreated by pulsed electric fields. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 33, 187–194.
- Chanvrier, H., Jakubczyk, E., Gondek, E., & Gumy, J. C. (2014). Insights into the texture of extruded cereals: Structure and acoustic properties. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 24, 61–68.
- Donsi, F., Ferrari, G., Maresca, P., & Pataro, G. (2011). Food quality: Control, analysis and consumer concerns. In D. A. Medina, & A. M. Laine (Eds.), *Food quality: Control, analysis and consumer concerns* (pp. 505–554). Nova Science Publishers, Inc.
- Frey, W., Gusbeth, C., Sakugawa, T., Sack, M., Mueller, G., Sigler, J., ... Teissie, J. (2016). Environmental applications, food and biomass processing by pulsed electric fields. In H. Akiyama, & R. Heller (Eds.), *Bioelectrics* (pp. 1–88). Japan: Springer.
- García-Ramos, F. J., Valero, C., Homer, I., Ortiz-Cañavate, J., & Ruiz-Altisent, M. (2005). Non-destructive fruit firmness sensors: A review. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 3(1), 61–73.
- Gironés-Vilaplana, A., Mena, P., García-Viguera, C., & Moreno, D. A. (2012). A novel beverage rich in antioxidant phenolics: Maqui berry (*Aristotelia chilensis*) and lemon juice. *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 279–286.
- Grimi, N., Mamouni, F., Lebovka, N., Vorobiev, E., & Vaxelaire, J. (2010). Acoustic impulse response in apple tissues treated by pulsed electric field. *Biosystems Engineering*, 105(2), 266–272.
- Grimi, N., Mamouni, F., Lebovka, N., Vorobiev, E., & Vaxelaire, J. (2011). Impact of apple processing modes on extracted juice quality: Pressing assisted by pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, 103, 52–61.
- Guerrouj, K., Sánchez-Rubio, M., Taboada-Rodríguez, A., Cava-Roda, R. M., & Marín-Iniesta, F. (2016). Sonication at mild temperatures enhances bioactive compounds and microbiological quality of orange juice. *Food and Bioprocess Technology*, 9, 20–28.
- Ikegwu, O. J., Ekwu, F. C., et al. (2009). Thermal and physical properties of some tropical fruits and their juices in Nigeria. *Journal of Food Technology*, 7(2), 38–42.
- Jaeger, H., Reineke, K., Schoessler, K., & Knorr, D. (2012). Effects of emerging processing technologies on food material properties. In B. Bhandari, & Y. H. Roos (Eds.), *Food materials science and engineering* (pp. 222–262). Wiley.
- Jaeger, H., Schulz, M., Lu, P., & Knorr, D. (2012). Adjustment of milling, mash electroporation and pressing for the development of a PEF assisted juice production in industrial scale. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 14, 46–60.
- Khan, M. K., Dangles, O., et al. (2014). A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(1), 85–104.
- Koubaa, M., Barba, F. J., Grimi, N., Mhemdi, H., Koubaa, W., Boussetta, N., & Vorobiev, E. (2016). Recovery of colorants from red prickly pear peels and pulps enhanced by pulsed electric field and ultrasound. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 336–344.
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Lebovka, N. I., Bazhal, M. I., & Vorobiev, E. (2001). Pulsed electric field breakage of cellular tissues: Visualisation of percolative properties. *Innovative Food Science &*

- Emerging Technologies*, 2(2), 113–125.
- Lebovka, N. I., Bazhal, M. I., & Vorobiev, E. (2002). Estimation of characteristic damage time of food materials in pulsed-electric fields. *Journal of Food Engineering*, 54(4), 337–346.
- Luengo, E., Álvarez, I., & Raso, J. (2013). Improving the pressing extraction of polyphenols of orange peel by pulsed electric fields. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 17, 79–84.
- M'hiri, N., Ioannou, I., Ghoul, M., & Boudhrioua, N. M. (2014). Extraction methods of citrus peel phenolic compounds. *Food Reviews International*, 30(4), 265–290.
- M'hiri, N., Ioannou, I., Ghoul, M., & Mihoubi Boudhrioua, N. (2017). Phytochemical characteristics of citrus peel and effect of conventional and nonconventional processing on phenolic compounds: A review. *Food Reviews International*, 33(6), 587–619.
- Miklavcic, D. (2017). *Handbook of electroporation*. Springer International Publishing.
- Mirabella, N., Castellani, V., & Sala, S. (2014). Current options for the valorization of food manufacturing waste: A review. *Journal of Cleaner Production*, 65, 28–41.
- Parniakov, O., Barba, F. J., Grimi, N., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2014). Impact of pulsed electric fields and high voltage electrical discharges on extraction of high-added value compounds from papaya peels. *Food Research International*, 65, 337–343.
- Parniakov, O., Barba, F. J., Grimi, N., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2016). Extraction assisted by pulsed electric energy as a potential tool for green and sustainable recovery of nutritionally valuable compounds from mango peels. *Food Chemistry*, 192, 842–848.
- Pichaiyongvongdee, S., & Haruenkit, R. (2009). Investigation of limonoids, flavanones, total polyphenol content and antioxidant activity in seven Thai pummelo cultivars. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 43(3), 458–466.
- Praporscic, I., Lebovka, N., Vorobiev, E., & Mietton-Peuchot, M. (2007). Pulsed electric field enhanced expression and juice quality of white grapes. *Separation and Purification Technology*, 52(3), 520–526.
- Puértolas, E., & Barba, F. J. (2016). Electrotechnologies applied to valorization of by-products from food industry: Main findings, energy and economic cost of their industrialization. *Food and Bioproducts Processing*, 100, 172–184.
- Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Režek Jambrak, A., Barba, F. J., Cravotto, G., Binello, A., ... Shpigelman, A. (2017). Innovative “green” and novel strategies for the extraction of bioactive added value compounds from citrus wastes — A review. *Molecules*, 22(5), 680.
- Rafiq, S., Kaul, R., Sofi, S. A., Bashir, N., Nazir, F., & Nayik, G. A. (2016). Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*.
- Rajha, H. N., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, R. G., & Vorobiev, E. (2014). A comparative study of physical pretreatments for the extraction of polyphenols and proteins from vine shoots. *Food Research International*, 65, 462–468.
- Rampersaud, G. C., & Valim, M. F. (2017). 100% citrus juice: Nutritional contribution, dietary benefits, and association with anthropometric measures. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(1), 129–140.
- Tanaka, T., Tanaka, T., Tanaka, M., & Kuno, T. (2011). Cancer chemoprevention by citrus pulp and juices containing high amounts of β -cryptoxanthin and hesperidin. *BioMed Research International*, 2012(516981) (10 pages).
- Tripoli, E., La Guardia, M., Giammanco, S., Di Majo, D., & Giammanco, M. (2007). Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*, 104(2), 466–479.
- Vorobiev, E., & Lebovka, N. (2011). Pulse electric field-assisted extraction. In N. Lebovka, E. Vorobiev, & F. Chemat (Eds.). *Enhancing extraction processes in the food industry* Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis LLC (p. 592).
- Vorobiev, E., & Lebovka, N. (2016). Chapter 7: Applications of pulsed electric energy for biomass pretreatment in biorefinery. In S. I. Mussatto (Ed.). *Biomass fractionation technologies for a lignocellulosic feedstock based biorefinery* Elsevier Publishing (pp. 151–168).
- Wang, T., Li, Q., & Bi, K. (2017). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.004>.
- Wiktor, A., Gondek, E., Jakubczyk, E., Nowacka, M., Dadan, M., Fijalkowska, A., & Witrowa-Rajchert, D. (2015). Acoustic emission as a tool to assess the changes induced by pulsed electric field in apple tissue. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 375–383.
- Yi, L., Ma, S., & Ren, D. (2017). Phytochemistry and bioactivity of Citrus flavonoids: A focus on antioxidant, anti-inflammatory, anticancer and cardiovascular protection activities. *Phytochemistry Reviews*, 16(3), 479–511.

3.1.2. Traitement des peaux d'agrumes avec les DEHT : intensification de l'extraction des polyphénols

3.1.2.1. Extraction des polyphénols à partir des peaux de pamplemousses : prétraitement avec les DEHT suivi d'une extraction solide-liquide dans les solvants verts

Cette étude repose sur l'extraction verte des polyphénols à partir des peaux d'agrumes. L'objectif principal est de trouver des solvants verts alternatifs aux solvants organiques et efficaces pour l'extraction des polyphénols. La sélectivité des solvants verts dans l'extraction du flavonoïde majoritaire présent dans les peaux de pamplemousses est étudiée par une modélisation théorique des paramètres de Hansen. Les DEHT sont réalisés dans un milieu aqueux contenant les peaux de pamplemousses. Ce traitement est ensuite suivi d'une diffusion dans des solvants verts comme les solvants eutectiques profonds et le glycérol aqueux. Le but de l'application des DEHT avant l'extraction solide-liquide dans les solvants verts, est l'augmentation de la surface d'échange et par suite l'amélioration du transport du solvant dans les cellules. L'effet synergique qui existe entre les DEHT et la diffusion dans les solvants proposés a été souligné par une modélisation de la cinétique d'extraction des polyphénols suivant la loi de Fick.

Suite à cette étude, l'article « Green extraction of polyphenols from grapefruit peels using high voltage electrical discharges, deep eutectic solvents and aqueous glycerol » a été soumis dans le journal « Food Chemistry » en 2018.

3.1.2.1.1. Résumé de l'article

Dans cette étude, les DEHT ont été testés comme méthode de prétraitement afin d'améliorer l'extraction solide-liquide conventionnelle, en remplaçant l'éthanol par d'autres solvants verts efficaces.

Les peaux de pamplemousses fraîches sont utilisées comme matière première. Le premier objectif est de trouver des solvants verts alternatifs qui pourront être utilisés dans l'extraction solide-liquide. Les solvants verts testés sont les solvants eutectiques profonds et le mélange eau/glycérol. Les solvants eutectiques profonds sont constitués de composants naturels, renouvelables, facilement disponibles et non toxiques. Leur préparation consiste à mélanger un accepteur d'un pont d'hydrogène (par exemple chlorure de choline) avec un donneur d'un pont d'hydrogène (acides aminés, acides carboxyliques, sucres). Les deux composants s'associent par une liaison par pont d'hydrogène, pour former un mélange eutectique ayant un point de fusion inférieur à celui de

chaque composant individuel. Le glycérol est une substance non toxique et peu coûteuse qui se trouve naturellement dans les aliments. Il peut être utilisé comme un co-solvant efficace pour changer la polarité de l'eau, augmentant ainsi, les rendements d'extraction.

Dans une première étape, plusieurs solvants eutectiques profonds et le mélange 20% glycérol/eau sont testés sur les peaux de pamplemousses intacts. L'efficacité de ces solvants est comparée avec celle de l'eau et de l'éthanol 50%. L'extraction solide-liquide est effectuée à 50°C pendant 1 h. Le ratio liquide-solide final est égal à 10. Les résultats ont montré que le solvant constitué d'acide lactique et de glucose, et le mélange 20% glycérol/eau sont les plus efficaces. Ils sont légèrement plus efficaces que l'éthanol 50% et ont amélioré l'extraction des polyphénols jusqu'à 1,3 et 1,4 fois, respectivement, en comparaison avec l'eau. Les résultats de l'HPLC ont montré que la naringine est le flavonoïde majoritaire dans les peaux de pamplemousses. Le mélange 20% glycérol/eau et le solvant eutectique profond (acide lactique : glucose) ont amélioré l'extraction de la naringine de 3 fois en comparaison avec l'eau. Ces solvants ont donc permis une nette amélioration de la naringine, alors que l'amélioration de l'extraction des polyphénols totaux est limitée. D'où la sélectivité d'extraction de ce flavonoïde. Il a été donc intéressant d'étudier la solubilité de la naringine par une modélisation théorique des paramètres de solubilité de Hansen de la naringine et des solvants étudiés.

Les DEHT sont ensuite testés comme méthode de prétraitement pour intensifier l'extraction solide-liquide dans les solvants choisis. Les peaux de pamplemousses fraîches sont prétraitées avec les DEHT dans l'eau en variant le nombre d'impulsions de 10 à 300 (7,27 à 218 kJ/kg). Une extraction solide-liquide est ensuite effectuée dans l'eau, le mélange 20% glycérol/eau ou le solvant eutectique profond. Après 10 min de diffusion, la concentration en polyphénols a augmenté de 1,68 g/100 g MS (dans l'eau) jusqu'à 1,86 g/100 g MS (dans 20% glycérol/eau) et 1,98 g/100 g MS (dans le solvant acide lactique : glucose) pour les peaux prétraitées avec les DEHT (72 kJ/kg). La modélisation de la cinétique d'extraction a montré qu'une valeur du coefficient de diffusion $D=4 \times 10^{-11}$ m²/s est atteinte avec une énergie des DEHT égale à 218 kJ/kg, quand la diffusion est faite dans l'eau. Cette même valeur est atteinte avec une énergie des DEHT égale à 36 kJ/kg, quand l'étape de diffusion qui suit est réalisée dans 20% glycérol/eau. L'utilisation du glycérol aqueux a donc permis de réduire l'énergie du prétraitement d'environ 6 fois.

Cette étude a montré que les solvants eutectiques profonds ou le glycérol aqueux ont significativement amélioré l'extraction des polyphénols, en particulier la naringine à partir des peaux de pamplemousses. L'application des DEHT dans l'eau avant l'extraction solide-liquide dans les solvants verts améliore les cinétiques et les rendements d'extraction. Les paramètres de solubilité de Hansen peuvent être utilisés comme méthode théorique pour prédire la solubilisation d'une molécule d'intérêt dans un solvant d'extraction. Cette modélisation permet de réduire le nombre d'expériences, en sélectionnant les solvants appropriés pour la solubilisation de la molécule d'intérêt.

3.1.2.1.2. Article: Green extraction of polyphenols from grapefruit peels using high voltage electrical discharges, deep eutectic solvents and aqueous glycerol

(Voir le manuscrit qui suit)

Green extraction of polyphenols from grapefruit peels using high voltage electrical discharges, deep eutectic solvents and aqueous glycerol

**Sally El Kantar^{a,b*}, Nadia Boussetta^b, Hiba N. Rajha^{a,b}, Richard G. Maroun^a,
Nicolas Louka^a, Eugène Vorobiev^b**

^aCentre d'Analyses et de Recherche, Unité de Recherche Technologies et Valorisations Agro-alimentaire, Faculté des Sciences, Université Saint-Joseph de Beyrouth, B.P. 17-5208 Riad El Solh, Beirut 1104 2020, Lebanon; E-Mails: sally.kantar@net.usj.edu.lb; hiba.rajha@usj.edu.lb; richard.maroun@usj.edu.lb; nicolas.louka@usj.edu.lb.

^bSorbonne universités, Université de technologie de Compiègne, laboratoire Transformations Intégrées de la Matière renouvelable (UTC/ESCOM, EA 4297 TIMR), Centre de recherche Royallieu, CS 60 319, 60 203 Compiègne cedex, France; E-Mails: sally.el-kantar@utc.fr; nadia.boussetta@utc.fr; eugene.vorobiev@utc.fr.

Contact information about Corresponding Author:

Sally, El Kantar

¹Centre d'Analyses et de Recherche, Unité de Recherche Technologies et Valorisation Agro-alimentaire, Faculté des Sciences, Université Saint-Joseph, B.P. 17-5208 Riad El Solh, Beirut 1104 2020, Lebanon

E-mail address: sally.kantar@net.usj.edu.lb

Abstract

Deep eutectic solvents and aqueous glycerol were proposed as green alternatives to conventional solvents for the extraction of polyphenols from grapefruit peels. In order to increase the extraction kinetics and yields of polyphenols, high voltage electrical discharges were used as a pre-treatment technology. The number of pulses during HVED pre-treatment was varied between 10 and 300, which corresponds to a total energy consumption between 7.27 and 218 kJ/kg. Obtained results showed the HVED energy input can be reduced, when the subsequent solid-liquid extraction was performed in 20% (w/v) aqueous glycerol or in deep eutectic solvent (lactic acid: glucose) instead of water. The addition of glycerol has reduced the energy of the HVED pre-treatment by 6 times. The same diffusivity of polyphenols ($4 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$) was obtained in water from HVED pre-treated grapefruit peels at 218 kJ/kg and in aqueous glycerol from pre-treated peels at 36 kJ/kg. A synergetic effect was observed between the HVED pre-treatment and the solid-liquid extraction in the green proposed solvents. The solubility of naringin, the main flavonoid compound of grapefruit peels in the solvents, was investigated through a theoretical modelling of its Hansen solubility parameters.

Keywords: High Voltage Electrical Discharges, Green Extraction, Deep Eutectic Solvents, Aqueous Glycerol

1. Introduction

Grapefruits are among the most important citrus crops. They are highly appreciated by the consumers, for containing many nutrients and phytochemicals that contribute to a healthy diet. They are consumed by both fresh market and for processing (Zheng, Zhang, Quan, Zheng, & Xi, 2016). The processing of grapefruits results in juice that accounts for about half of the fruit weight, and the rest are by-products consisting of peels, seeds and pulps (Wilkins, Widmer, Grohmann, & Cameron, 2007). Peels remain as the primary by-product and are a rich source of natural antioxidants (Ahmad & Langrish, 2012). Polyphenols have attracted much attention due to their use in food industries to prevent the rancidity and oxidation of lipids. They are also beneficial against many diseases related to the oxidative stress such as cancer (Hajj, Debs, Nguyen, Maroun, & Louka, 2013; Khan, Abert-Vian, Fabiano-Tixier, Dangles, & Chemat, 2010; Lagha-Benamrouche & Madani, 2013; M'hiri, Ioannou, Mihoubi Boudhrioua, & Ghoul, 2015).

Among the polyphenols present in grapefruit peels, naringin is the most abundant flavonoid. It has many pharmacological activities. It is also used as a food additive to treat obesity and diabetes (Liu, Qiao, Gu, Yang, & Yang, 2017; Raafat et al., 2018). Therefore, it is advantageous to extract polyphenols and specifically naringin from grapefruit peels.

Conventional extraction techniques are usually associated with long extraction times, important amount of organic solvent consumption and the possible thermal degradation of polyphenols (Azmir et al., 2013). Most organic solvents are flammable, volatile, explosive, toxic and are responsible for environmental pollution and the greenhouse effect (Capello, Fischer, & Hungerbühler, 2007; Chemat, Vian, & Cravotto, 2012). Therefore, they are incompatible with the principle of the “green” extraction process, and their elimination from the extracts is mandatory. The development of green solvents with low toxicity and cost, as alternatives to hazardous organic solvents has been receiving increasing attention (Bi, Tian, & Row, 2013).

Deep eutectic solvents (DES) are promising alternatives to traditional organic solvents. They are mixtures of natural, renewable, readily available and non-toxic components (Cunha & Fernandes, 2018). The preparation of DES is easy and cheap. It consists in mixing a hydrogen bond acceptor (e.g. choline-chloride) with a hydrogen bond donor (natural plant-based organic ions, such as amino acids, carboxylic acids, sugars). The components associate by hydrogen bonding to form an eutectic mixture, that has a lower melting point than that of each individual component. DES are liquid at low temperatures, miscible with water, non-flammable and highly viscous (Bajkacz

& Adamek, 2017; Bakirtzi, Triantafyllidou, & Makris, 2016; Bi et al., 2013; Dai, Verpoorte, & Choi, 2014; García, Rodríguez-Juan, Rodríguez-Gutiérrez, Rios, & Fernández-Bolaños, 2016; Zhuang, Dou, Li, & Liu, 2017). DES have been recently used in many applications such as the stabilization of natural pigments (Dai et al., 2014), the drug solubilization (Morrison, Sun, & Neervannan, 2009) and the delignification (Malaeke, Housaindokht, Monhemi, & Izadyar, 2018). Also, there is a number of studies on the extraction of bioactive compounds including rutin (Huang et al., 2017), catechin (Jeong et al., 2017), furanocoumarin (Wang et al., 2017), isoflavones (Bajkacz & Adamek, 2017) and flavonoids (Bakirtzi et al., 2016; Bi et al., 2013; Duan, Dou, Guo, Li, & Liu, 2016; Zhuang et al., 2017) with DES.

Glycerol is a non-toxic and inexpensive substance that occurs naturally in foods. It can be used as an efficient co-solvent to change the polarity of water, increasing thus, the recovery of polyphenols (Apostolakis, Grigorakis, & Makris, 2014; Karakashov, Grigorakis, Loupassaki, & Makris, 2015). Pre-treatments are generally applied to enhance the extraction kinetics and yields during the subsequent solid-liquid extraction. Among the non-conventional pre-treatment methods, high voltage electrical discharges (HVED) have been applied to improve the extraction of biomolecules (Gros, Lanoisellé, & Vorobiev, 2003; Rajha, Boussetta, Louka, Maroun, & Vorobiev, 2015). This technology is based on the electrical breakdown in water. When an electric field is applied, an avalanche of electrons called streamer is created. When the electric field is intense, the streamer propagates from the positive to the negative electrode, and an electrical breakdown in water occurs. The electrical breakdown is accompanied by a number of secondary phenomena (high amplitude shock waves, bubbles cavitation, turbulence of liquid) that cause the particle fragmentation and cell damage (Boussetta, Lesaint, & Vorobiev, 2013).

To the best of our knowledge, there is still no report on the evaluation of the potential and effectiveness of DES and glycerol for the extraction of polyphenols from citrus peels. This work is devoted to study the effect of HVED pre-treatment on the subsequent solid-liquid extraction of polyphenols from grapefruit peels, with green solvents. The main objective is to find alternative green solvents for the extraction of polyphenols from grapefruit peels.

2. Materials and Methods

2.1. Citrus peels

Grapefruits were purchased at a local supermarket (Compiègne, France) and stocked at 4°C. Those without any damage were washed and peeled. Fresh peels were cut into squares of 1 cm² and stored at 4°C until use. The dry matter content, measured by drying 20 g of fresh orange peels at 100°C to constant weight, was 25 wt%.

2.2. Preparation of the deep eutectic solvents

DES with choline-chloride and lactic acid as hydrogen bond donors, were used in this study. The synthesis of all DES was based on previously reported methodologies (Bubalo, Ćurko, Tomašević, Kovačević Ganić, & Radojčić Redovniković, 2016). Choline-chloride (hydrogen bond donor) was mixed with lactic acid and tartaric acid. Lactic acid (hydrogen bond donor) was mixed with sodium acetate, ammonium acetate, glucose and glycine. Components were directly weighed at predetermined molar ratios (Table 1) and the mixtures were heated at 80°C for 2 to 6 h under stirring, until a perfectly transparent liquid was formed. Incorporation of 30% water was necessary to reduce the viscosity of the DES and facilitate polyphenols diffusion. DES were kept in sealed glass flasks in the dark, at ambient temperature. The codes of the DES used in this study are given in Table 1.

Water and 50% (v/v) ethanol/water were used for comparison. Preliminary experiments showed that ethanol concentration of 50% is optimal for the extraction of polyphenols from grapefruit peels. At concentrations higher than 50% the polyphenol yields decreased. Therefore, an intermediate (optimal) solvent polarity, can give the highest polyphenol extraction.

Table 1. List of choline-chloride based-DES and lactic acid-based DES used in this study

Component 1	Component 2	Molar ratio	Code
Choline-chloride	Lactic acid	3:1	DES-1
	Tartaric acid	2:1	DES-2
Lactic acid	Sodium acetate	3:1	DES-3
	Ammonium acetate	3:1	DES-4
	Glycine	3:1	DES-5
	Glucose	5:1	DES-6

2.3. Extraction experiments

The general scheme of experiments is shown in figure 1. After the selection of the most efficient solvents, fresh grapefruit peels were pretreated with HVED, in water at different number of pulses. After HVED pre-treatment, the solvents were added to the solution (pre-treated peels + water) for the subsequent solid-liquid extraction.

2.3.1. High voltage electrical discharges pre-treatment

Fresh grapefruit peels (20 g) and water (180 mL) were introduced in a Teflon cylindrical treatment chamber (Innovaltech, Saint Quentin) between two electrodes: needle (d= 10 mm) and plane (d = 35 mm). The distance between the electrodes was 5 mm. The treatment chamber was connected to a generator that provided the maximum voltage U of 40 kV and current of 10 kA. Pulses had a frequency of 0.5 Hz and an average energy of 160 J/pulse. In this study, the number of pulses n was varied between 10 and 300. The HVED energy input W_{HVED} , varied between 7.27-218 kJ/kg, was calculated as shown in Eq. (1):

$$W_{HVED} = \frac{W_i \times n}{m} \quad (1)$$

where W_i is the energy per pulse (kJ/pulse), n is the number of pulses, and m is the mass of the suspension (kg).

2.3.2. Solid-liquid extraction

For the experiments without HVED pre-treatment, the solid-liquid extraction was conducted in water, 50% (v/v) ethanol/water or in the prepared DES. The liquid to solid ratio was 10, and the extraction was conducted at 50°C for 60 min, under stirring at 160 rpm. For the experiments with HVED, the diffusion was conducted in water, aqueous glycerol (10, 20 and 30% (w/v) glycerol/water) or with the most efficient DES (lactic acid: glucose). HVED pre-treatment was carried in water, then DES or glycerol were added at the beginning of the diffusion process. The final liquid to solid ratio was 10. Following extraction, samples were filtered and the extracts were submitted to further analysis.

2.4. Analysis

2.4.1. Polyphenols extraction index Z_p

In order to evaluate the efficiency of the HVED pre-treatment, the normalized polyphenol content was calculated as follows:

$$Z_p = \frac{[C] - [C_0]}{[C_{max}] - [C_0]} \quad (2)$$

Where C is the polyphenol concentration after the HVED, C₀ is the polyphenol concentration in the extraction medium without HVED pre-treatment (fresh intact peels) and C_{max} is the maximal value of polyphenol concentration obtained from milled peels without HVED pre-treatment.

2.4.2. Total polyphenol content

The amount of total polyphenol content extracted was determined using the Folin-Ciocalteu colorimetric method (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventós, 1998). The extract (0.2 mL) was mixed with 1 mL of ten-fold diluted Folin–Ciocalteu reagent (Merck, Darmstadt, Germany). Then 0.8 mL of sodium carbonate (Na₂CO₃) (75 g/L) (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France) was added. The mixture was incubated at 60°C for 10 min. After cooling at room temperature, the absorbance was measured at 750 nm by the UV-Vis spectrophotometer (Thermo Spectronic Genesys 20, Thermo Electron Corporation, MA, USA). Gallic acid (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) was used for the calibration curve. The results were expressed as g of Gallic acid equivalent (GAE) per 100 gram of dry matter (g GAE/100 g DM).

2.4.3. High performance liquid chromatography analysis

High performance liquid chromatography (HPLC) was used to identify the phenolic compounds extracted from grapefruit peels. Ultimate 3000 (Dionex, Idstein, Germany) liquid chromatography apparatus coupled to a diode array detector was used. The chromatography column C18 capillary column 100 × 4.6 mm (Hypersil Gold, Thermo Scientific, USA), was used for all experiments. The temperature of the column was maintained at 30°C. 97% water, 3% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid (solvent A) and acetonitrile (solvent B) (HPLC grade, Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) were used as solvents. A flow rate of 1.250 mL/min was applied. The elution profile of solvent B was as follows: 10 min, 2% ; 25 min, 6% ; 40 min, 15% ; 52 min, 20% ; 70 min, 40%. The injection volume of the sample was 100 µL. Chromatograms were recorded using the photodiode array detector at 280 nm. The flavonoid was identified according to its retention time in comparison to the commercial standard. Naringin (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) was used as standard. It was solubilized in 50% ethanol-water. Extracts were also diluted in 50% ethanol-water. Prior to analyses, samples and standards were filtered through 0.2 µm syringe filters (VWR, France). The external standard method was used for quantification.

A linear regression of the peak area vs. concentration (0.03 to 1 mg/mL) was used and the final concentrations were expressed in g per 100 g dry matter (g/100 g DM).

2.4.4. Diffusion coefficients

The diffusivity of polyphenols was studied using Fick's second law (Crank, 1975).

The geometry of orange peels was considered as plane for the experiments without and with HVED pre-treatment.

The diffusion in a plane sheet, with agitation and in a limited volume follows the following formula (Crank, 1975):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2\alpha(\alpha+1)\exp(-Dq_n^2 t/l^2)}{1+\alpha+q_n^2 \alpha^2} \quad (3)$$

Where M_t is the polyphenol concentration in the extract after time t , M_∞ is the maximal concentration of polyphenol after an infinite time, α is the liquid-solid ratio (10), D is the coefficient of diffusion (m^2/s), l is the thickness of the particles, $n=5$, $q_1=1.5708$, $q_2=4.7124$, $q_3=7.854$, $q_4=10.9956$ and $q_5=14.1372$.

2.4.5. Hansen solubility parameters

The Hansen solubility parameter is divided into 3 components: δ_D for dispersion (van der Waals), δ_P for polarity and δ_H for hydrogen bonding. For naringin and solvents, Hansen's solubility parameters are calculated using the method of Hoftyzer and Krevelen (Van Krevelen & Nijenhuis, 2009):

$$\delta_D = \Sigma F_{Di} / V \quad (5)$$

$$\delta_P = \sqrt{\Sigma F_{Pi}^2} / V \quad (6)$$

$$\delta_H = \sqrt{\Sigma E_{Hi}} / V \quad (7)$$

Where F_{Di} and F_{Pi} are the group contributions to the dispersion and polar components per structural group to the molar attraction constant, E_{Hi} is the hydrogen bonding energy per structural group, and V is the molar volume of the molecule. The numerical values of F_{Di} , F_{Pi} , and E_{Hi} of common structural groups are taken from the literature (Van Krevelen & Nijenhuis, 2009).

The calculated solubility parameters can be placed on three axes x , y , and z (δ_D , δ_P and δ_H). A sphere can then be plotted. The center of the sphere corresponds to the solubility parameters of naringin. The radius of the sphere is determined experimentally by testing the solubility of naringin in different solvents. Effective and suitable solvents for solubilization of naringin are those within

the sphere. Solvents that are not appropriate for the solubilization of naringin will therefore be outside the sphere. The sphere is drawn using the Matlab 2015b program. The distance R_i between the naringin (center of the sphere) and every solvent is calculated as follows (Li, Fabiano-Tixier, Ginies, & Chemat, 2014):

$$R_i^2 = 4 [\delta_D (A) - \delta_D (B)]^2 + [(\delta_P (A) - \delta_P (B))]^2 + [(\delta_H (A) - \delta_H (B))]^2 \quad (8)$$

Where A refers to the solute (naringin) and B to the solvent.

2.5. Statistical analysis

All experiments and measurements were repeated at least three times. One-way analysis of variance was used for statistical analysis of the data using the Statgraphics plus (version 5.1, Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA). For each analysis, significance level of 5% was assumed. The error bars presented on the figures correspond to the standard deviations.

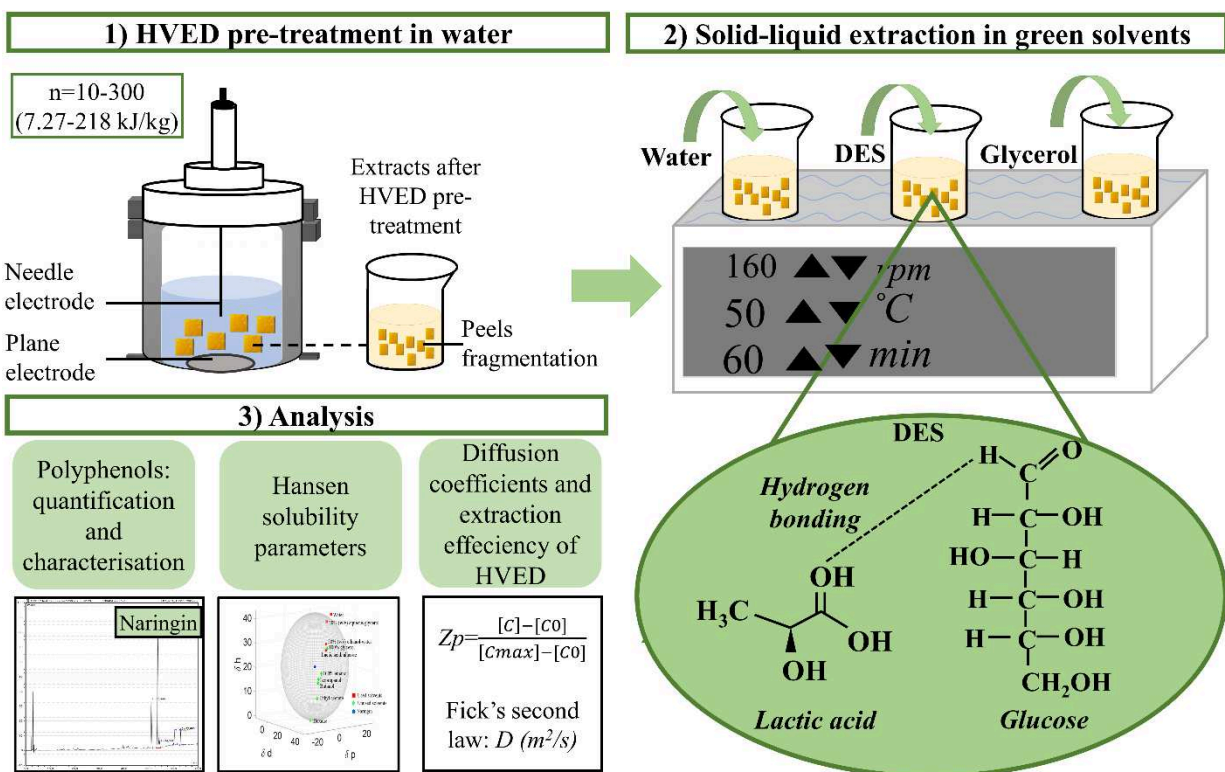


Figure 1. Experimental setup.

3. Results and discussions

3.1. Solid-liquid extraction in green solvents

Figure 2 shows the relative total polyphenols increase C/C_0 as a function of the solvent nature. An ANOVA analysis was performed to evaluate if there were significant differences in the

polyphenols content of the extracts. Results showed that DES-6 (Lactic acid: glucose) and 20% (w/v) aqueous glycerol have the best extraction efficiency. They improved the extraction of polyphenols up to 1.3 and 1.4 times, respectively, in comparison with water. These results are in agreement to those obtained by other authors (Bubalo, Ćurko, Tomašević, Kovačević Ganić, & Radojčić Redovniković, 2016) who found the DES containing choline-chloride and oxalic acid allowed 5 and 2-fold higher extraction of anthocyanin from grape peels, than water and methanol, respectively. The concentration of herein extracted from Greek medicinal plants with a DES containing lactic acid, glycine and water, was 1.7 times higher than that achieved with 80% ethanol (Bakirtzi et al., 2016). DES have the capacity to donate and accept protons and electrons, which allows the formation of hydrogen bonds between the polyphenols and the DES molecules, thus enhancing their dissolution capacity (Radošević et al., 2016; Shishov, Bulatov, Locatelli, Carradori, & Andruch, 2017). No statistical difference was obtained between DES-1 to 5. Their efficiency was similar to ethanol. The polarity of these DES may be close to that of ethanol. Note that the polarity of DES may be affected by the addition of water. So the solubilizing capacity of the same DES can increase by varying the percentage of water according to the target compounds. For example, rutin was more soluble in choline chloride: glucose with 5% water, but carthamin showed the highest solubility in the same DES with 10% water (Dai, van Spronsen, Witkamp, Verpoorte, & Choi, 2013). In this study, the percentage of water that must be added to DES has not been optimised and the extraction conditions were adjusted by adding 30% of water (Bajkacz & Adamek, 2017). It has been shown that low water concentrations (10-15%) can decrease the extraction efficiency because of the high viscosity of the DES. Also high water concentrations (40-75%), can limit the interactions between DES and the target compounds by affecting the hydrogen bonding interactions (García et al., 2016).

Previous studies also showed the efficiency of using glycerol as a co-solvent to improve the extraction of bioactive compounds. Using 10% glycerol in water permitted increase the yields of polyphenols from the plant *Hypericum perforatum* from 71 mg GAE /g DM (with pure ethanol) to 86 mg GAE /g DM. Glycerol can change the dielectric constant of water. The polarity of the medium would therefore be modified, which can improve the extraction of certain bioactive compounds (Karakashov et al., 2015).

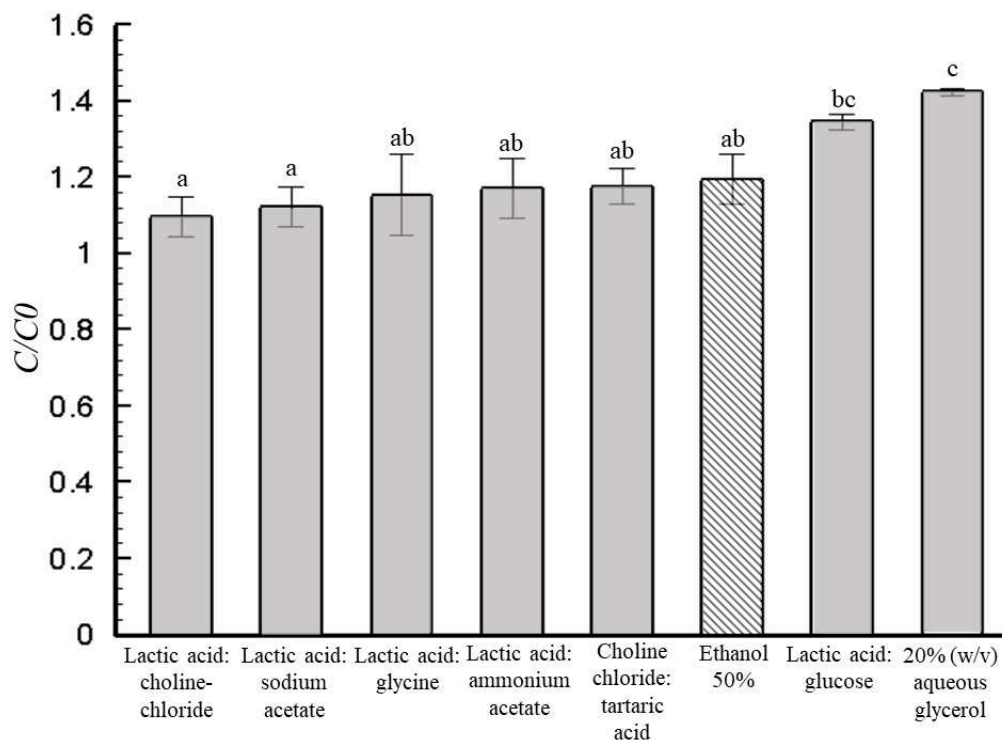


Figure 2. Effect of the solvent nature on the relative extraction of total polyphenols, C/C_0 . (C corresponds to the total polyphenols content after a 1 h extraction in a selected solvent, C_0 corresponds to the total polyphenols content after extraction in water in the same conditions).

3.2. Efficiency of the solvents on the extraction of naringin

The HPLC was realised for the extracts obtained from milled grapefruit peels, after the solid-liquid extraction with the conventional solvents (water and 50% (v/v) ethanol/water) and with the proposed green solvents (aqueous glycerol and DES-6), without HVED pre-treatment (results not shown). The analysis revealed that naringin is the major flavonoid in grapefruit peels. Similar chromatograms (Figure 3) were obtained for all the extracts, but with different surfaces of the peaks. This result shows that there is no selectivity in the extraction of some polyphenols when using these different solvents. The only difference is the concentration of the extracted polyphenols. Table 2 shows the concentrations of naringin obtained using different solvents and the improvement of naringin extraction compared to water. Aqueous glycerol and DES-6 improved the extraction of naringin by 3 times compared to water, and their effectiveness is approximately similar to that of ethanol. Therefore, they allowed a clear improvement in the extraction of naringin compared to water, while the improvement of the extraction of total

polyphenols was limited. This shows the selectivity of the proposed solvents for the extraction of naringin. The obtained result is interesting, since naringin molecule has many pharmacological properties such as hepatoprotective, anti-diabetic and cardioprotective. Naringin has also a therapeutic role in various neurological disorders such as Parkinson disease (Viswanatha, Shylaja, & Moolemath, 2017). Due to the interesting properties of this molecule, many studies aimed to increase the solubility of the naringin, by its complexation with beta-cyclodextrin (Cui, Zhang, Sun, & Jia, 2012) or by adding flavonoids as a compatibilizer (Evans, T.C., Gavrilovich, E., Mihai, R.C. and Isbasescu, I., 2015).

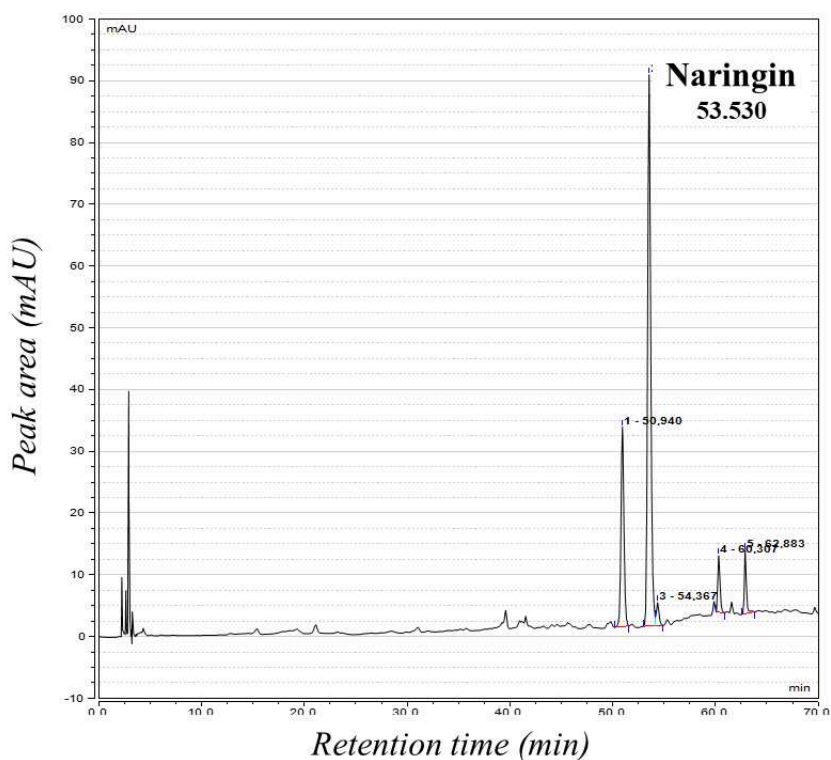


Figure 3. The HPLC chromatogram obtained from grapefruit peels extracts in water. Similar chromatograms were obtained for grapefruit peels extracts in 50% ethanol/water, aqueous glycerol and DES-6 with different surfaces of the peaks.

Table 2. The concentrations of naringin extracted with aqueous glycerol and DES in comparison with water and ethanol.

Solvent	Concentration of naringin (g/100 g DM)	Improvement of naringin extraction, in comparison with water
Water	0.575 +/- 0.040	1
50% (v/v) ethanol/water	2.092 +/- 0.088	3.64
20% (w/v) aqueous glycerol	1.9695 +/- 0.087	3.42
DES-6 (lactic acid: glucose)	1.864 +/- 0.079	3.24

The solubility of naringin in the proposed solvents is investigated through a theoretical modelling of its Hansen Solubility Parameters (HSP). Figure 4 shows the three dimensional Hansen solubility sphere for naringin in different solvents. The green diamonds in the sphere correspond to the Hansen solubility parameters (δ_D , δ_P , δ_H) of the solvents that were used as references to determine the radius of the sphere ($R_s=22.1$). The solubility of naringin in these solvents was already studied (Zhang et al., 2015). The red squares represent the solubility parameters of the solvents that were used for the extraction of polyphenols. The HSP for solvents and naringin were calculated from their structures according to Hoftyzer and Krevelen method, and their calculated and theoretical values are presented in Table 3 (Van Krevelen & Nijenhuis, 2009). They were used in plotting a 3D HSP sphere for theoretical characterization of naringin solubility in each solvent. The diamonds and squares located inside the sphere are generally considered as good solvents and those located outside the sphere have relatively poor capacity to dissolve naringin. The smaller the R_i is, the greater is the affinity between naringin and the solvents. The organic solvents (butanol, isopropanol, ethyl acetate and ethanol) have the smallest R_i . However, the objective is to replace these solvents with green solvents, efficient for the solubilization of naringin. DES-6 and aqueous glycerol are placed inside the HSP sphere, so they are good solvents for naringin solubilisation. However, 50% ethanol-water and DES-6 were closer to the HSP centre than the aqueous glycerol. Previous HPLC results have shown that the efficiency of aqueous glycerol and DES-6 is comparable to that of 50% ethanol-water.

Therefore, a slight divergence exists between the final extraction yield of naringin obtained by aqueous glycerol and the value of the HSP for the same solvent. 20% (w/v) glycerol-water had relatively high δ_h value due to the presence of relatively high amount of water. This divergence can be explained by the fact that the HSP value can only predict the capacity of the solvents to dissolve naringin, but will not affect the diffusion process and the final extraction yields (Li, Fabiano-Tixier, Ginies, & Chemat, 2014).

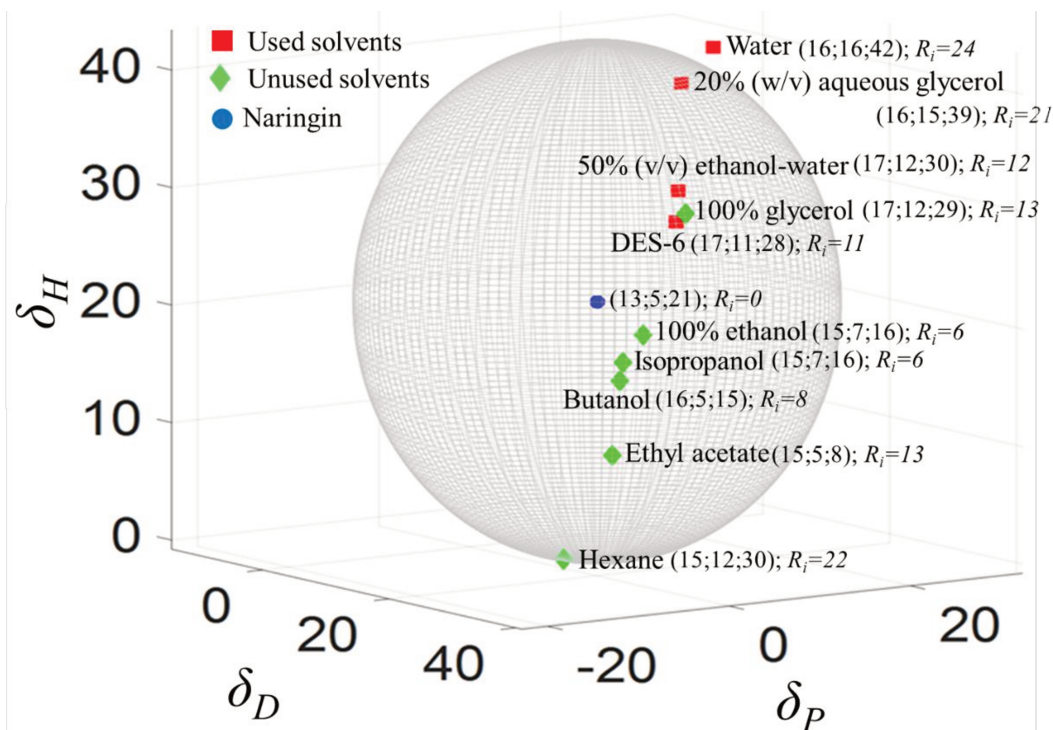


Figure 4. Three dimensional Hansen solubility sphere ($R_s=22.1$) of all solvents and naringin

Table 3. Predicted and theoretical values of Hansen solubility parameters of naringin and solvents. R_i represents the distance between the naringin (center of the sphere) and every solvent.

		Experimental values				Theoretical values		
		δ_D	δ_P	δ_H	R_i	δ_D	δ_P	δ_H
Solute	Naringin	13.3	4.7	21.3	0	-	-	-
Used solvents	Water	11.6	27.7	33.3	24	15.6	16	42.3
	20% (w/v) aqueous glycerol	15.9	15.2	39.6	21	-	-	-

	50% (v/v) ethanol- water	15.4	12.2	30.3	12	-	-	-
	DES-6	16.5	11.3	27.9	11	-	-	-
Unused solvents	100% glycerol	17.1	11.9	28.7	13	17.4	12.1	29.3
	100% ethanol	15.2	8.5	18.4	6	15.8	8.8	19.4
	Isopropanol	14.8	6.5	16.2	6	15.8	6.1	16.4
	Butanol	15.8	5.5	14.8	8	16	5.7	15.8
	Ethyl acetate	15.4	5	8.5	13	15.8	5.3	7.2
	Hexane	14.7	0	0	22	14.9	0	0

3.3. Intensification of polyphenols extraction in green solvents by HVED pre-treatment

Aqueous glycerol and DES are green solvents that can be used as alternatives to hazardous organic solvents in the conventional solid-liquid extraction. To enhance the yields and the kinetics of polyphenols extraction during the solid-liquid extraction, grapefruit peels were pre-treated with HVED in water. The use of HVED is in correspondence with the green extraction concept. This concept is based on using renewable plant material and green solvents as alternative to hazardous solvents. It includes also the use of technologies or extraction processes, that will reduce the energy consumption and allow the obtention of high quality extracts (Chemat, Vian, & Cravotto, 2012). Figure 5 presents the effect of the HVED energy input on the polyphenols extraction index Z_p . The value of Z_p is related to the release of polyphenols from the treated cells. It increases gradually with the increase of the HVED energy input. The variation of the energy from 7.27 to 72 kJ/kg, significantly enhanced the liberation of polyphenols and the value of Z_p increased from 0.36 to 0.72, respectively where it reached a plateau. The disintegration of grapefruit peels could be visually observed during HVED pre-treatment (photos in Figure 4). For $W=7$ kJ/kg, peels are still intact. The fragmentation of the product increases with the HVED energy input, and the size of grapefruit peels significantly decreased when the energy varied from 7.27 to 72 kJ/kg.

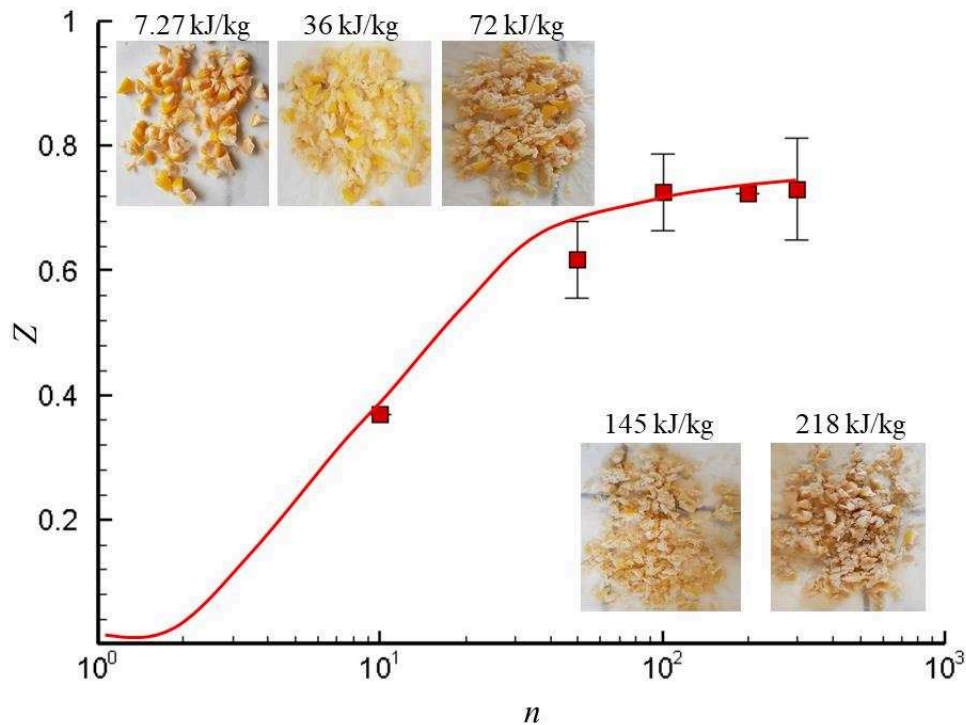


Figure 5. The variation of the polyphenols extraction index Z_p as function of the HVED energy input. Insert shows the photos of grapefruit peels after HVED pre-treatment at different energy inputs.

Similar results were observed earlier on flaxseed cake (Boussetta et al., 2013). The values of Z_p increased gradually with the treatment duration and the maximal value was obtained after 5 ms of treatment. Additional discharges did not increase the extraction of polyphenols and the optimal treatment duration was fixed at 5 ms (Boussetta et al., 2013).

Figure 6 shows the effect of the HVED energy input on the polyphenols content during the subsequent solid liquid extraction in water. In the first 10 min of diffusion, the polyphenols were progressively released from grapefruit peels to the solvent. After 20 min, the diffusion of the polyphenols increased very slowly. Without this electrical pre-treatment, the concentration of polyphenols obtained after 10 min of diffusion was 1.33 g/100 g DM. With HVED, the subsequent extraction of polyphenols increased. Polyphenol concentration was increased to 1.55, 1.63, 1.67, 1.72 and 1.88 g/100 DM when the HVED energy input attained respectively 7, 36, 72, 145 and 218 kJ/kg. Recent works report that the solid-liquid extraction of polyphenols from grapefruit peels at different time, temperature and ethanol concentration, gave a concentration of polyphenols between 0.4 and 5.5 g/ 100 g DM (Garcia-castello et al., 2015). The results of HVED are in

agreement with those obtained by other authors who found an improvement in the extraction efficiency of the biomolecules by increasing the number of pulses during HVED pre-treatment (Almohammed et al., 2017; Moubarik, El-Belghiti, & Vorobiev, 2011). During HVED pre-treatment, the explosion of cavitation bubbles and the propagation of shock waves cause the fragmentation of the particles which increases the surface area and improves the diffusion of biomolecules (Boussetta, Lesaint, & Vorobiev, 2013; Rajha, Boussetta, Louka, Maroun, & Vorobiev, 2014, 2015).

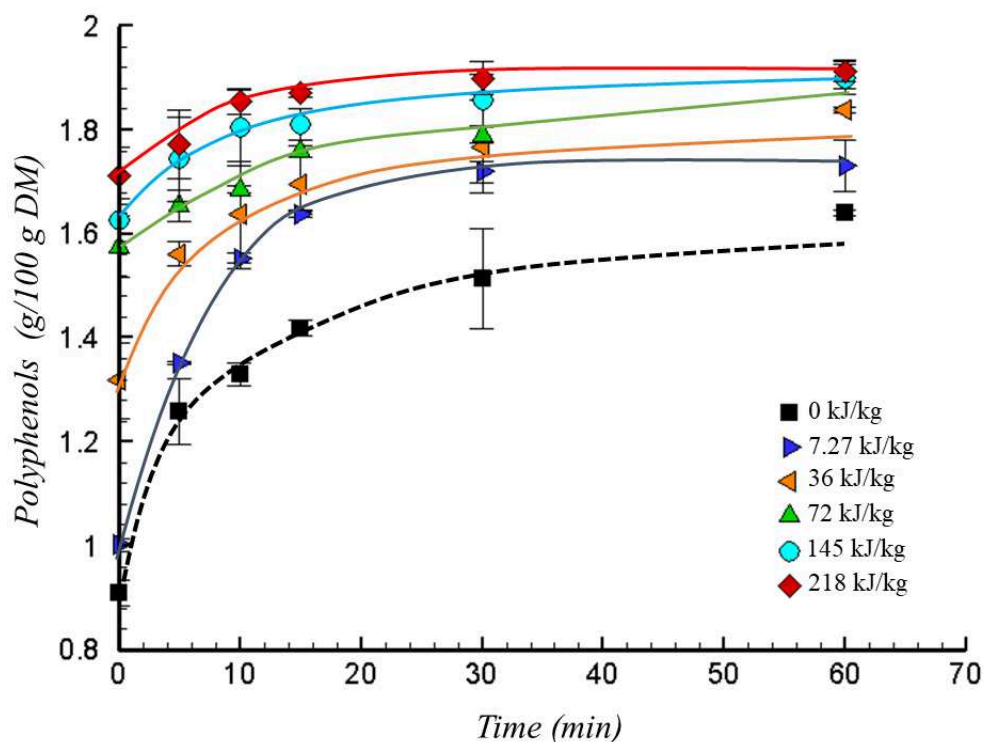


Figure 6. Effect of the HVED energy input on the polyphenols content during the subsequent solid liquid extraction in water

Figure 7 presents the effect of the HVED energy input on the polyphenols content during the subsequent solid liquid extraction in 20% (w/v) aqueous glycerol. Without HVED pre-treatment, after 10 min of diffusion, the concentration of polyphenols obtained with 20% (w/v) water/glycerol (1.53 g/100 g DM) was higher than that obtained in water (1.33 g/100 g DM). This efficiency could be attributed to the extraction of more polar compounds with water/glycerol mixtures. After 10 min of diffusion, the same concentration of polyphenols (≈ 1.9 g/100 g DM) was obtained for $W=72$ kJ/kg followed by solid-liquid extraction in aqueous glycerol and for $W=218$ kJ/kg followed

by solid-liquid extraction in water. Combining HVED pre-treatment with extraction in aqueous glycerol had a very marked effect. The cell disintegration and product fragmentation during HVED increase the exchange surface and enhance the solvent transport into cells. Similar results were observed in the literature. The HVED pre-treatment of grape pomace (Boussetta et al., 2011) or grape stems (Brianceau, Turk, Vitrac, & Vorobiev, 2016) has increased the aqueous extraction of polyphenols, but in the presence of ethanol, polyphenols extraction was significantly better.

Insert in Figure 7 shows the effect of the HVED energy input on the diffusion coefficient D (m^2/s) of polyphenols. Without HVED pre-treatment, the diffusivities of polyphenols were $2.3 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ and $2.9 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ in water and aqueous glycerol, respectively. This difference can be attributed to the solubility of polyphenols, which is higher in the glycerol-water mixture than in water only. The intracellular polyphenols diffusivities were higher after the application of HVED pre-treatment. For $W=72 \text{ kJ/kg}$, the value of D increased from $4 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ (in water) to $6 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ (in glycerol-water). Moreover, the same diffusivity of polyphenols ($4 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$) is attained for $W=218 \text{ kJ/kg}$ followed by S-L extraction in water and for $W=36 \text{ kJ/kg}$ followed by S-L extraction in aqueous glycerol. Therefore, the addition of glycerol has reduced the energy of the HVED pre-treatment by 6 times. Hence the advantage of using 20% (w/v) aqueous glycerol instead of only water during the S-L extraction, is to reduce the duration and consequently the energy of the HVED pre-treatment.

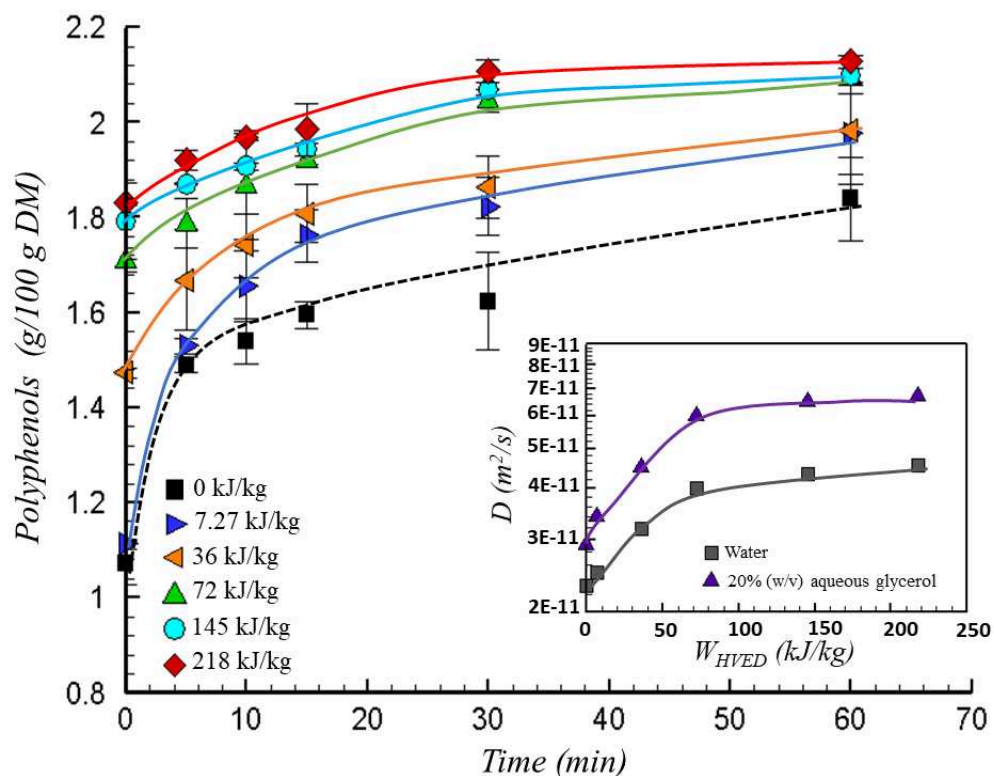


Figure 7. Effect of the HVED energy input on the polyphenols content during the subsequent solid liquid extraction in 20% (w/v) aqueous glycerol. Insert shows the effect of the HVED energy input on the diffusion coefficient D (m^2/s) of polyphenols.

Figure 8 shows the effect of glycerol percentage and DES-6 on the extraction of polyphenols from HVED pre-treated grapefruit peels. According to the previous result (Figure 5), and for avoiding long time of treatment and high energy consumption, the HVED energy input was fixed at 72 kJ/kg. The increase in glycerol percentage from 10 to 30% has increased the yields of polyphenols from 1.77 g/100 DM to 1.93 g/100 g DM. This can be attributed to the polarity of glycerol, which has a dielectric constant (44.38) lower than that of water (80.1) and can decrease the polarity of the mixture, allowing thus the solubilisation of higher amounts of polyphenols (Katsampa, Valsamedou, Grigorakis, & Makris, 2015). The glycerol percentage of 30% has not been exceeded, because the viscosity of water / glycerol mixture (at 50 °C) became very high. DES-6 gave a yield of polyphenols slightly higher to that obtained with 20% (w/v) glycerol/water. Insert in Figure 8 shows the increase in the diffusion coefficients as a function of the content of glycerol in water, with and without HVED. Without HVED, the values of D increased from $2.32 \times 10^{-11} m^2/s$ to $3.57 \times 10^{-11} m^2/s$ when the glycerol % was varied from 0 to 30%. With HVED, the increase in the values

of D was more pronounced (from $4 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ to $6.64 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$). Therefore, there is a synergetic effect between HVED pre-treatment and the diffusion in aqueous glycerol.

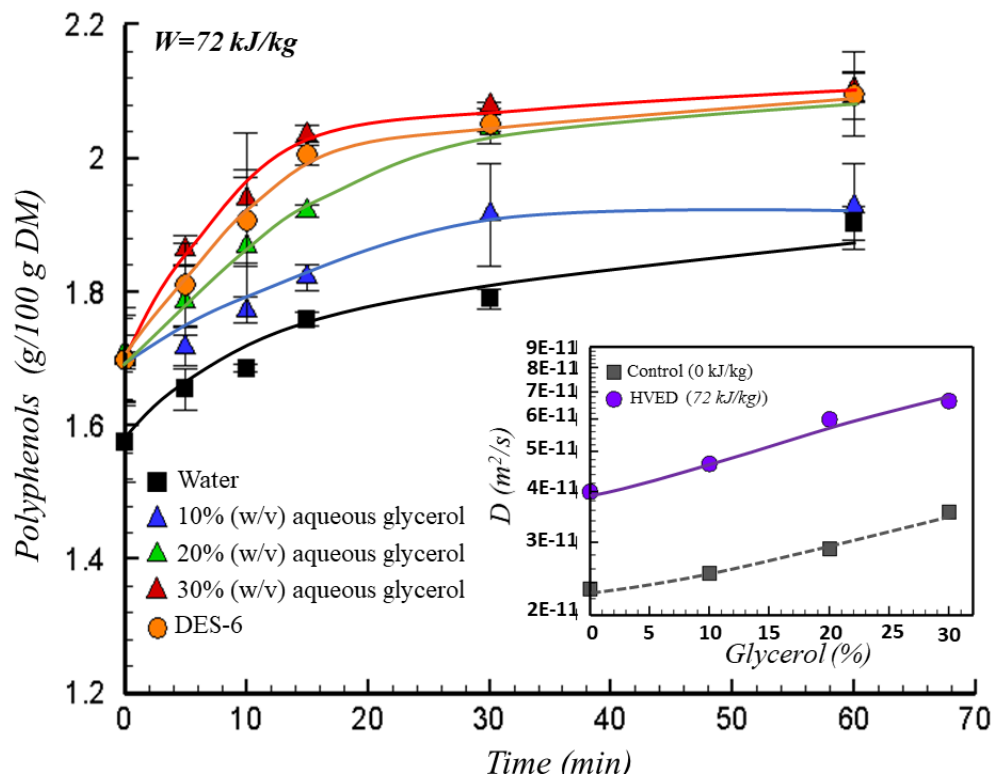


Figure 8. Effect of the glycerol content and the DES-6 on the polyphenols content during solid-liquid extraction from HVED pre-treated samples ($W=72 \text{ kJ/kg}$). Insert shows the corresponding diffusion coefficient D of polyphenols as function of the glycerol % for untreated ($W=0 \text{ kJ/kg}$) and treated ($W=72 \text{ kJ/kg}$) grapefruit peels.

4. Conclusions

This study has shown that deep eutectic solvents or aqueous glycerol are the green solvents that could replace the conventional solvents for the extraction of polyphenols from grapefruit peels. They significantly enhanced the extraction of polyphenols and especially the flavonoid naringin from grapefruit peels, in comparison with water. The Hansen solubility parameters can be used as a theoretical method to predict the solubilisation of naringin in the solvents. This modelling can reduce the number of experiments by selecting the appropriate solvents for the solubilization of the molecule of interest. The HVED pre-treatment of grapefruit peels allowed a significant enhancement of the extraction kinetics and the yields of polyphenols during the subsequent solid-liquid extraction. The effect of the HVED energy input on the polyphenols extraction was

estimated through the calculation of the polyphenols extraction index. The calculation of the diffusion coefficients showed that the energy of the HVED pre-treatment can be reduced by 6 times if the subsequent solid-liquid extraction is conducted in aqueous glycerol instead of water.

Funding

This work was supported by the Lebanese National Council For Scientific Research (CNRS-L) and by Université de Technologie de Compiègne, France.

References

- Ahmad, J., & Langrish, T. A. G. (2012). Optimisation of total phenolic acids extraction from mandarin peels using microwave energy: The importance of the Maillard reaction. *Journal of Food Engineering*, 109(1), 162–174. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.09.017>
- Almohammed, F., Koubaa, M., Khelfa, A., Nakaya, M., Mhemdi, H., & Vorobiev, E. (2017). Pectin recovery from sugar beet pulp enhanced by high-voltage electrical discharges. *Food and Bioproducts Processing*, 103, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.03.005>
- Apostolakis, A., Grigorakis, S., & Makris, D. P. (2014). Optimisation and comparative kinetics study of polyphenol extraction from olive leaves (*Olea europaea*) using heated water/glycerol mixtures. *Separation and Purification Technology*, 128, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.03.010>
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Bajkacz, S., & Adamek, J. (2017). Evaluation of new natural deep eutectic solvents for the extraction of isoflavones from soy products. *Talanta*, 168(August 2016), 329–335. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.02.065>
- Bakirtzi, C., Triantafyllidou, K., & Makris, D. P. (2016). Novel lactic acid-based natural deep eutectic solvents: Efficiency in the ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from common native Greek medicinal plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 3(3), 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.03.003>
- Bi, W., Tian, M., & Row, K. H. (2013). Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization.

- Journal of Chromatography A, 1285, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.041>
- Boussetta, N., Lesaint, O., & Vorobiev, E. (2013). A study of mechanisms involved during the extraction of polyphenols from grape seeds by pulsed electrical discharges. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 19, 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.03.007>
- Boussetta, N., Turk, M., De Taeye, C., Larondelle, Y., Lanoisellé, J. L., & Vorobiev, E. (2013). Effect of high voltage electrical discharges, heating and ethanol concentration on the extraction of total polyphenols and lignans from flaxseed cake. *Industrial Crops and Products*, 49, 690–696. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.004>
- Boussetta, N., Vorobiev, E., Deloison, V., Pochez, F., Falcimaigne-Cordin, A., & Lanoisellé, J. L. (2011). Valorisation of grape pomace by the extraction of phenolic antioxidants: Application of high voltage electrical discharges. *Food Chemistry*, 128(2), 364–370. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.035>
- Brianceau, S., Turk, M., Vitrac, X., & Vorobiev, E. (2016). High voltage electric discharges assisted extraction of phenolic compounds from grape stems: Effect of processing parameters on flavan-3-ols, flavonols and stilbenes recovery. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 35, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.04.006>
- Bubalo, C. M., Čurko, N., Tomašević, M., Kovačević Ganić, K., & Radojčić Redovniković, I. (2016). Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 200, 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.040>
- Capello, C., Fischer, U., & Hungerbühler, K. (2007). What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. *Green Chemistry*, 9(9), 927. <https://doi.org/10.1039/b617536h>
- Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615–8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
- Crank, J. (1975). *The Mathematics of Diffusion*: 2d Ed. [https://doi.org/10.1016/0306-4549\(77\)90072-X](https://doi.org/10.1016/0306-4549(77)90072-X)
- Cui, L., Zhang, Z. H., Sun, E., & Jia, X. Bin. (2012). Effect of β -cyclodextrin complexation on solubility and enzymatic conversion of naringin. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 14251–14261. <https://doi.org/10.3390/ijms131114251>

- Cunha, S. C., & Fernandes, J. (2018). Extraction techniques with deep eutectic solvents. *Trends in Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.05.001>
- Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 766, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>
- Dai, Y., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2014). Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*). *Food Chemistry*, 159, 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.155>
- Duan, L., Dou, L.-L., Guo, L., Li, P., & Liu, E.-H. (2016). Comprehensive Evaluation of Deep Eutectic Solvents in Extraction of Bioactive Natural Products. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(4), 2405–2411. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b00091>
- Evans, T.C., Gavrilovich, E., Mihai, R.C. and Isbasescu, I., E. L. (2015). (12) Patent Application Publication (10) Pub . No .: US 2006 / 0222585 A1 Figure 1, 2(15), 354. <https://doi.org/10.1037/t24245-000>
- Garcia-castello, E. M., Rodriguez-lopez, A. D., Mayor, L., Ballesteros, R., Conidi, C., & Cassano, A. (2015). LWT - Food Science and Technology Optimization of conventional and ultrasound assisted extraction of flavonoids from grapefruit (*Citrus paradisi* L .) solid wastes. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1114–1122. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.024>
- García, A., Rodríguez-Juan, E., Rodríguez-Gutiérrez, G., Rios, J. J., & Fernández-Bolaños, J. (2016). Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESs). *Food Chemistry*, 197, 554–561. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.131>
- Gros, C., Lanoisellé, J. L., & Vorobiev, E. (2003). Towards an alternative extraction process for linseed oil. *Chemical Engineering Research and Design*, 81(9), 1059–1065. <https://doi.org/10.1205/026387603770866182>
- Hajj, Y. El, Debs, E., Nguyen, C., Maroun, R. G., & Louka, N. (2013). Syrah) . Extraction Process through Optimization by Response Surface Methodology, 2013(December), 1209–1220.
- Huang, Y., Feng, F., Jiang, J., Qiao, Y., Wu, T., Voglmeir, J., & Chen, Z. G. (2017). Green and efficient extraction of rutin from tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 221, 1400–1405. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.013>
- Jeong, K. M., Ko, J., Zhao, J., Jin, Y., Yoo, D. E., Han, S. Y., & Lee, J. (2017). Multi-functioning deep eutectic solvents as extraction and storage media for bioactive natural products that are

- readily applicable to cosmetic products. *Journal of Cleaner Production*, 151, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.038>
- Karakashov, B., Grigorakis, S., Loupassaki, S., & Makris, D. P. (2015). Optimisation of polyphenol extraction from *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) using aqueous glycerol and response surface methodology. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2014.11.002>
- Katsampa, P., Valsamedou, E., Grigorakis, S., & Makris, D. P. (2015). A green ultrasound-assisted extraction process for the recovery of antioxidant polyphenols and pigments from onion solid wastes using Box-Behnken experimental design and kinetics. *Industrial Crops and Products*, 77, 535–543. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.039>
- Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Dangles, O., & Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 119(2), 851–858. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.046>
- Lagha-Benamrouche, S., & Madani, K. (2013). Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*, 50, 723–730. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.048>
- Li, Y., Fabiano-Tixier, A. S., Ginies, C., & Chemat, F. (2014). Direct green extraction of volatile aroma compounds using vegetable oils as solvents: Theoretical and experimental solubility study. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2P1), 724–731. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.064>
- Liu, Z., Qiao, L., Gu, H., Yang, F., & Yang, L. (2017). Development of Brønsted acidic ionic liquid based microwave assisted method for simultaneous extraction of pectin and naringin from pomelo peels. *Separation and Purification Technology*, 172, 326–337. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.08.026>
- M'hiri, N., Ioannou, I., Mihoubi Boudhrioua, N., & Ghoul, M. (2015). Effect of different operating conditions on the extraction of phenolic compounds in orange peel. *Food and Bioprocess Processing*, 96, 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.07.010>
- Malaeke, H., Housaindokht, M. R., Monhemi, H., & Izadyar, M. (2018). Deep eutectic solvent as an efficient molecular liquid for lignin solubilization and wood delignification. *Journal of*

- Molecular Liquids, 263, 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.05.001>
- Morrison, H. G., Sun, C. C., & Neervannan, S. (2009). Characterization of thermal behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles. *International Journal of Pharmaceutics*, 378(1–2), 136–139. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.05.039>
- Moubarik, A., El-Belghiti, K., & Vorobiev, E. (2011). Kinetic model of solute aqueous extraction from Fennel (*Foeniculum vulgare*) treated by pulsed electric field, electrical discharges and ultrasonic irradiations. *Food and Bioprocess Processing*, 89(4), 356–361. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.09.002>
- Raafat, K., El-Darra, N., Saleh, F. A., Rajha, H. N., Maroun, R. G., & Louka, N. (2018). Infrared-Assisted Extraction and HPLC-Analysis of *Prunus armeniaca* L. Pomace and Detoxified-Kernel and their Antidiabetic Effects. *Phytochemical Analysis*, 29(2), 156–167. <https://doi.org/10.1002/pca.2723>
- Radošević, K., Čurko, N., Gaurina Srček, V., Cvjetko Bubalo, M., Tomašević, M., Kovačević Ganić, K., & Radojčić Redovniković, I. (2016). Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. *LWT - Food Science and Technology*, 73, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.037>
- Rajha, H. N., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, R. G., & Vorobiev, E. (2014). A comparative study of physical pretreatments for the extraction of polyphenols and proteins from vine shoots. *Food Research International*, 65(PC), 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.024>
- Rajha, H. N., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, R. G., & Vorobiev, E. (2015). Effect of alternative physical pretreatments (pulsed electric field, high voltage electrical discharges and ultrasound) on the dead-end ultrafiltration of vine-shoot extracts. *Separation and Purification Technology*, 146, 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.03.058>
- Shishov, A., Bulatov, A., Locatelli, M., Carradori, S., & Andruch, V. (2017). Application of deep eutectic solvents in analytical chemistry. A review. *Microchemical Journal*, 135, 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.07.015>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1998). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)

- Van Krevelen, D. W., & Nijenhuis, K. T. (2009). Properties of polymers: their correlation with chemical structure; their numerical estimation and prediction from additive group contributions.
- Viswanatha, G. L., Shylaja, H., & Moolemath, Y. (2017). The beneficial role of Naringin- a citrus bioflavonoid, against oxidative stress-induced neurobehavioral disorders and cognitive dysfunction in rodents: A systematic review and meta-analysis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 94, 909–929. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.072>
- Wang, T., Jiao, J., Gai, Q.-Y., Wang, P., Guo, N., Niu, L.-L., & Fu, Y.-J. (2017). Enhanced and green extraction polyphenols and furanocoumarins from Fig (*Ficus carica* L.) leaves using deep eutectic solvents. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 145, 339–345. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.07.002>
- Wilkins, M. R., Widmer, W. W., Grohmann, K., & Cameron, R. G. (2007). Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes. *Bioresource Technology*, 98(8), 1596–1601. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.06.022>
- Zhang, J., Zhang, P., Liu, T., Zhou, L., Zhang, L., Lin, R., ... Li, Y. (2015). Solubility of naringin in ethanol and water mixtures from 283.15 to 318.15 K. *Journal of Molecular Liquids*, 203, 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2014.12.039>
- Zheng, H., Zhang, Q., Quan, J., Zheng, Q., & Xi, W. (2016). Determination of sugars, organic acids, aroma components, and carotenoids in grapefruit pulps. *Food Chemistry*, 205, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.007>
- Zhuang, B., Dou, L. L., Li, P., & Liu, E. H. (2017). Deep eutectic solvents as green media for extraction of flavonoid glycosides and aglycones from *Platycladi Cacumen*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 134, 214–219. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.11.049>

3.1.2.2. Combinaison des décharges électriques de haute tension avec l'hydrolyse enzymatique pour l'extraction des polyphénols et des sucres fermentescibles à partir des peaux d'oranges

Dans une deuxième étude, les DEHT sont combinés à l'hydrolyse enzymatique. Le mélange enzymatique utilisé permet la solubilisation de la paroi cellulaire végétale, accélérant ainsi la libération des polyphénols piégés dans les polysaccharides. Le traitement électrique permet la fragmentation des particules, ce qui pourra faciliter l'accès des enzymes à leur substrat. La combinaison des deux traitements permettra donc d'intensifier l'extraction des polyphénols. Vu que les polysaccharides sont le substrat des enzymes, on s'est intéressé aussi au dosage des sucres fermentescibles libérés durant l'extraction. L'objectif est donc de sélectionner la meilleure combinaison des deux traitements électrique et biologique, afin d'intensifier l'extraction des molécules bioactives.

L'article « High voltage electrical discharges combined with enzymatic hydrolysis for extraction of polyphenols and fermentable sugars from orange peels » a été publié dans le journal « Food Research International » en 2018.

3.1.2.2.1. Résumé de l'article

Les peaux d'oranges sont utilisées comme matière première. Les microondes sans solvant sont d'abord utilisées pour l'extraction des huiles essentielles à partir des peaux d'oranges. Ensuite les décharges électriques de haute tension et l'hydrolyse enzymatique sont appliqués séparément sur les peaux d'oranges déshuilées. Dans le but d'augmenter les cinétiques et les rendements d'extraction, les deux traitements sont combinés. Les DEHT sont appliqués avant, durant ou après l'hydrolyse enzymatique.

L'énergie optimale des DEHT pour l'extraction des polyphénols (0,7 g/100 g MS) et des sucres réducteurs (20 g/100 g MS) est de 222 kJ/kg (10 min de traitement). Au-delà de cette énergie, la concentration en polyphénols diminue légèrement et la concentration en sucres reste à peu près la même. Après 180 min d'hydrolyse enzymatique avec la Viscozyme® L (12 FBGU/g de peau), les concentrations en sucres et en polyphénols atteignent 48 g/100 g MS et 0,85 g/100 g MS, respectivement. Comparée aux DEHT, l'hydrolyse enzymatique a permis d'extraire un rendement en sucres plus élevé et presque un même rendement en polyphénols mais pour une durée plus longue. Pour cette raison, les deux traitements sont combinés, afin d'extraire à la fois les

polyphénols et les sucres avec des rendements élevés et des durées plus courtes. Le prétraitement des peaux avec les microondes sans solvant, a permis d'une part l'extraction des huiles essentielles, et d'autre part l'amélioration de l'extraction des sucres et des polyphénols durant les DEHT et l'hydrolyse enzymatique.

L'application des DEHT (222 kJ/kg) sur les peaux d'oranges avant l'hydrolyse enzymatique a permis d'obtenir les rendements maximaux en polyphénols et en sucres réducteurs après seulement 2 min d'hydrolyse enzymatique. Les DEHT permettent la fragmentation des peaux d'oranges, ce qui augmente la surface d'accessibilité des substrats aux enzymes, et accélère la libération des biomolécules durant l'hydrolyse enzymatique.

Les DEHT peuvent être utilisées comme une méthode alternative pour le prétraitement des peaux d'agrumes avant l'hydrolyse enzymatique et la fermentation. Les DEHT sont considérées comme une technologie « verte ». Elles peuvent remplacer l'utilisation des méthodes de prétraitement chimiques qui consomment du temps et de l'énergie. La combinaison des DEHT avec l'hydrolyse enzymatique, a permis à la fois d'améliorer les cinétiques et les rendements d'extraction des polyphénols et des sucres réducteurs.

3.1.2.2.2. Article: High voltage electrical discharges combined with enzymatic hydrolysis for extraction of polyphenols and fermentable sugars from orange peels

(Voir le manuscrit qui suit)



Review

High voltage electrical discharges combined with enzymatic hydrolysis for extraction of polyphenols and fermentable sugars from orange peels

Sally El Kantar^{a,b,*}, Nadia Boussetta^b, Hiba N. Rajha^{a,b}, Richard G. Maroun^a, Nicolas Louka^a, Eugène Vorobiev^b

^a Centre d'Analyses et de Recherche, Unité de Recherche Technologies et Valorisations Agro-alimentaire, Faculté des Sciences, Université Saint-Joseph de Beyrouth, B.P. 17-5208 Riad El Solh, Beirut 1104 2020, Lebanon

^b Sorbonne universités, Université de technologie de Compiègne, laboratoire Transformations Intégrées de la Matière renouvelable (UTC/ESCOM, EA 4297 TIMR), Centre de recherche Royallieu, CS 60 319, 60 203 Compiègne cedex, France



ARTICLE INFO

Keywords:

Orange peels
Extraction
High voltage electrical discharges
Enzymatic hydrolysis
Polyphenols
Fermentable sugars

ABSTRACT

Orange peels are a biomass rich in carbohydrates and polyphenols and characterized by their low lignin content. This work focuses on finding the best combination between physical and biological treatments to enhance the extraction of fermentable sugars and polyphenols. High voltage electrical discharges (HVED) (0 to 900 kJ/kg) or enzymatic hydrolysis with Viscozyme® L (12 FBGU/g) were applied on fresh or defatted orange peels for the extraction of polyphenols and fermentable sugars. An HVED energy input of 222 kJ/kg was optimal for the extraction of reducing sugars (19 g/100 g DM) and polyphenols (0.7 g/100 g DM). However, enzymatic hydrolysis allowed a higher extraction of reducing sugars (50 g/100 g DM). HVED were then applied prior or simultaneously to enzymatic hydrolysis to maximize the extraction of biomolecules from orange peels. Thus, the results clearly showed that the HVED pretreatment of orange peels is efficient to enhance the accessibility of cellulosic biomass to enzymes. HVED (222 kJ/kg) prior to enzymatic hydrolysis (12 FBGU/g), was the most effective combination of these two processes to get an intensive extraction of biomolecules from orange peels.

1. Introduction

Oranges are the most abundant citrus fruits (Luengo, Álvarez, & Raso, 2013). When extracting orange juice, a large quantity of by-products is formed such as peels, pulps and seeds (Rezzadori, Benedetti, & Amante, 2012). Peels are the major residue of this fruit and account for about half of its weight (Khan, Abert-Vian, Fabiano-Tixier, Dangles, & Chemat, 2010; Li, Smith, & Hossain, 2006; Luengo et al., 2013; Maran, Sivakumar, Thirugnanasambandham, & Sridhar, 2013). Moreover, they have been studied as a source of different biomolecules such as polyphenols (Hegazy & Ibrahim, 2012; Khan et al., 2010; Lagha-Benamrouche & Madani, 2013; Li et al., 2006; Luengo et al., 2013; M'hiri, Ioannou, Boudhrioua, & Ghoul, 2015), essential oils (Allaf, Tomao, Ruiz, & Chemat, 2013; Bousbia, Vian, Ferhat, Meklati, & Chemat, 2009; Ferhat, Meklati, & Chemat, 2007; Ferhat, Meklati, Smadja, & Chemat, 2006; Rezzoug & Louka, 2009; Sahraoui, Vian, El Maataoui, Boutekdjiret, & Chemat, 2011) and sugars (Choi, Lee, Khanal, Park, & Bae, 2015).

Soluble (glucose, fructose, sucrose) and insoluble (pectin, cellulose,

hemicellulose) carbohydrates existing in orange peels (Rivas, Torrado, Torre, Converte, & Dominguez, 2008) are an excellent raw material for conversion into biological biofuels, such as ethanol and biogas (Putnik et al., 2017). A pretreatment step is usually required before enzymatic hydrolysis to release fermentable sugars from carbohydrate polymers, for the production of biofuels (Satari & Karimi, 2018). Different pretreatments such as, steam explosion (Boluda-Aguilar & López-Gómez, 2013), acid pretreatment (Widmer, Zhou, & Grohmann, 2010) and popping pretreatment (Choi, Kim, Wi, Kim, & Bae, 2013) were applied on citrus peels waste for the production of biofuels. Physical and chemical pretreatments can be time and energy consuming and can have negative impacts on the environment. For this reason, green and innovative techniques such as ultrasounds, microwaves and pulsed electric fields can be used to reduce the use of hazardous solvents, to contribute to environmental preservation and to decrease the energy consumption (Chemat et al., 2017).

Polyphenols are known for their antiradical activities. They are used in food industries, mainly to avoid the rancidity of lipids (Khan et al., 2010). In medicine, they are known for their anti-carcinogenic and anti-

* Corresponding author at: Sorbonne Universités, Université de Technologie de Compiègne, Laboratoire de Transformations Intégrées de la Matière Renouvelable, EA 4297, Centre de Recherches de Royallieu, BP 20529, 60205 Compiègne Cedex, France.

E-mail addresses: sally.kantar@net.usj.edu.lb, sally.el-kantar@utc.fr (S. El Kantar), nadia.boussetta@utc.fr (N. Boussetta), hiba.rajha@usj.edu.lb (H.N. Rajha), richard.maroun@usj.edu.lb (R.G. Maroun), nicolas.louka@usj.edu.lb (N. Louka), eugene.vorobiev@utc.fr (E. Vorobiev).

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.070>

Received 3 November 2017; Received in revised form 16 January 2018; Accepted 28 January 2018

Available online 01 February 2018

0963-9969/ © 2018 Published by Elsevier Ltd.

inflammatory properties (Zou, Xi, Hu, Nie, & Zhou, 2016). Polyphenols were extracted from orange peels by conventional methods using organic solvents (Hegazy & Ibrahim, 2012; Lagha-Benamrouche & Madani, 2013; Li et al., 2006) or enzymes (Li et al., 2006). Enzymes facilitate the extraction of intracellular components by disintegrating cell wall matrices (Guan & Yao, 2008). Enzymatic hydrolysis allowed the extraction of polyphenols after 51 h from citrus peels (Li et al., 2006) and after 12 h from apples (Zheng, Hwang, & Chung, 2009). To avoid long extraction times and huge amounts of solvents, innovative methods like ultrasounds (Khan et al., 2010), microwaves (M'hiri et al., 2015) and pulsed electric fields (Luengo et al., 2013) were applied to extract polyphenols from citrus peels.

High voltage electrical discharges (HVED) were one of the considered treatments for different food wastes (Almohammed et al., 2017; Barba, Boussetta, & Vorobiev, 2015; Boussetta et al., 2013; Parniakov, Barba, Grimi, Lebovka, & Vorobiev, 2014; Rajha, Boussetta, Louka, Maroun, & Vorobiev, 2015a). Electrical breakdown in water occurs when an avalanche of electrons called “streamer” spreads from the positive to the negative grounded electrode (Boussetta, Vorobiev, Le, Cordin-Falcimaigne, & Lanoisellé, 2012). HVED can damage the cell structure and fragment the particles. This is due to a number of secondary phenomena like liquid turbulence, cavitation and high amplitude pressure shock waves that appear in water (Liu, Vorobiev, Savoie, & Lanoisellé, 2011). HVED proved to be effective for polyphenols extraction from vine shoots (Rajha et al., 2015a; Rajha, Boussetta, Louka, Maroun, & Vorobiev, 2014) and grape pomace (Boussetta et al., 2012). Recently, it was shown that HVED can be successfully used in different biorefinery applications: to decrease the severity of alkali and organosolv delignification and to enhance the enzymatic hydrolysis of rape-seed straw (Brahim et al., 2016).

To our knowledge, the HVED have not yet been applied to orange peels waste. The novelty of this study is to propose an original polyphenols and reducing sugars recovery method from orange peels, by combining HVED with enzymatic hydrolysis. The main objective of this work is to determine the most effective chronology of these two processes that improves the extraction rates and the extraction yields of biomolecules from orange peels.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Oranges (Salustiana from Spain) were obtained from a local market (Compiègne, France). Those without any damage were washed with distilled water and peeled. Fresh peels were cut into squares of 1 cm² and stored at 4 °C until use. The dry matter content, measured by drying 20 g of fresh orange peels at 100 °C to constant weight, was 46 wt%.

2.2. Extraction experiments

The general scheme of experiments is shown in Fig. 1. Microwaves were used for defatting the orange peels. The extraction of polyphenols and reducing sugars from fresh and defatted orange peels was conducted using HVED and enzymatic hydrolysis separately or combining these treatments.

2.2.1. Microwaves

Microwaves were used to defat the orange peels. Fresh orange peels (200 g), without solvent addition, were put in a round-bottom flask. The flask was then placed in the microwave reactor MW Milestone (NEOS - GR, Station Gravity Microwave, Shelton, USA) having maximal power of 900 W. Evaporated essential oil was condensed in a refrigerator outside the microwave. Essential oil was separated from water by decantation, then collected and stored at 4 °C. In this study, the microwave power was set to 200 W. The treatment time was 10 min, which corresponds to the energy input of 1200 kJ/kg. Preliminary

results showed that at this energy, most essential oil was extracted without burning the orange peels or losing their sugars.

The energy was calculated as shown in Eq. (1):

$$W_{MW} = \frac{\text{Power} \times t_{MW}}{m} \quad (1)$$

where t_{MW} is the total treatment duration (s) and m is the product's mass (kg).

2.2.2. High voltage electrical discharges

Orange peels (20 g) and water (160 g at 50 °C) were introduced in the treatment chamber between two electrodes: needle (d = 10 mm) and plane (d = 35 mm) (Fig. 1.a). The distance between the electrodes was 5 mm. The HVED generator (Tomsk Polytechnic University, Russia) connected to the treatment chamber provided a maximum voltage of 40 kV and a maximum current of 10 kA. Pulses had a frequency of 0.5 Hz and an average energy of 160 J/pulse. The electrical discharges were created by electrical breakdown in water. When an intense electrical field is generated, an avalanche of electrons spread from the high voltage needle electrode to the grounded one. An electrical breakdown occurs, and is accompanied by the number of secondary phenomena (high amplitude shock waves, bubbles cavitation, turbulence of liquid...). These phenomena improve the extraction of biomolecules from the cytoplasm of the cells. In this study, HVED were applied on the suspension for 0–40 min. Fresh and defatted orange peels were compared. The HVED energy input W_{HVED} , varied between 0 and 900 kJ/kg, was calculated as shown in Eq. (2):

$$W_{HVED} = \frac{W_i \times n}{m} \quad (2)$$

where W_i is the energy per pulse (kJ/pulse), n is the number of pulses, and m is the mass of the suspension (kg).

2.2.3. Enzymatic hydrolysis

Orange peels (20 g) and water (160 g at 50 °C) were introduced in a 500 mL capacity flask. Viscozyme® L at the concentration of 12 fungal β -Glucanase Units (FBGU)/g of orange peel was added to water. It is a multi-enzyme complex containing arabanase, cellulase, β -glucanase, hemicellulase, and xylanase. The diffusion process was conducted at 50 °C, pH of 4.5 and stirring at 160 rpm from fresh and defatted orange peels (Fig. 1.b). The duration of enzymatic hydrolysis was varied from 2 to 180 min.

2.2.4. Thermal extraction: “control” experiments

For control experiments, fresh or defatted orange peels (20 g) were placed in water (160 g at 50 °C) in a 500-mL capacity flask. An agitation at 160 rpm was provided and a temperature of 50 °C was maintained constant during extraction.

2.2.5. HVED combined with enzymatic hydrolysis

2.2.5.1. Successive HVED and enzymatic hydrolysis. To accelerate and enhance the extraction of polyphenols and reducing sugars from orange peels, HVED were combined to enzymatic hydrolysis. HVED (44, 222 and 448 kJ/kg) were applied on defatted orange peels (20 g of orange peels with 160 g water at 50 °C) prior to enzymatic hydrolysis. Then the enzyme mixture was added to the HVED pretreated orange peels in a quantity of 12 FBGU/g of orange peel. The extraction process was conducted at 50 °C, pH of 4.5 for 180 min.

2.2.5.2. Simultaneous HVED and enzymatic hydrolysis. The enzyme mixture was added to the untreated by HVED orange peels, in a quantity of 12 FBGU/g of orange peel at 50 °C, pH of 4.5 for 60 min. Then HVED were applied with an energy input of 222 kJ/kg. After HVED treatment, the enzymatic hydrolysis was continued to have a total duration of 180 min at 50 °C, pH of 4.5.

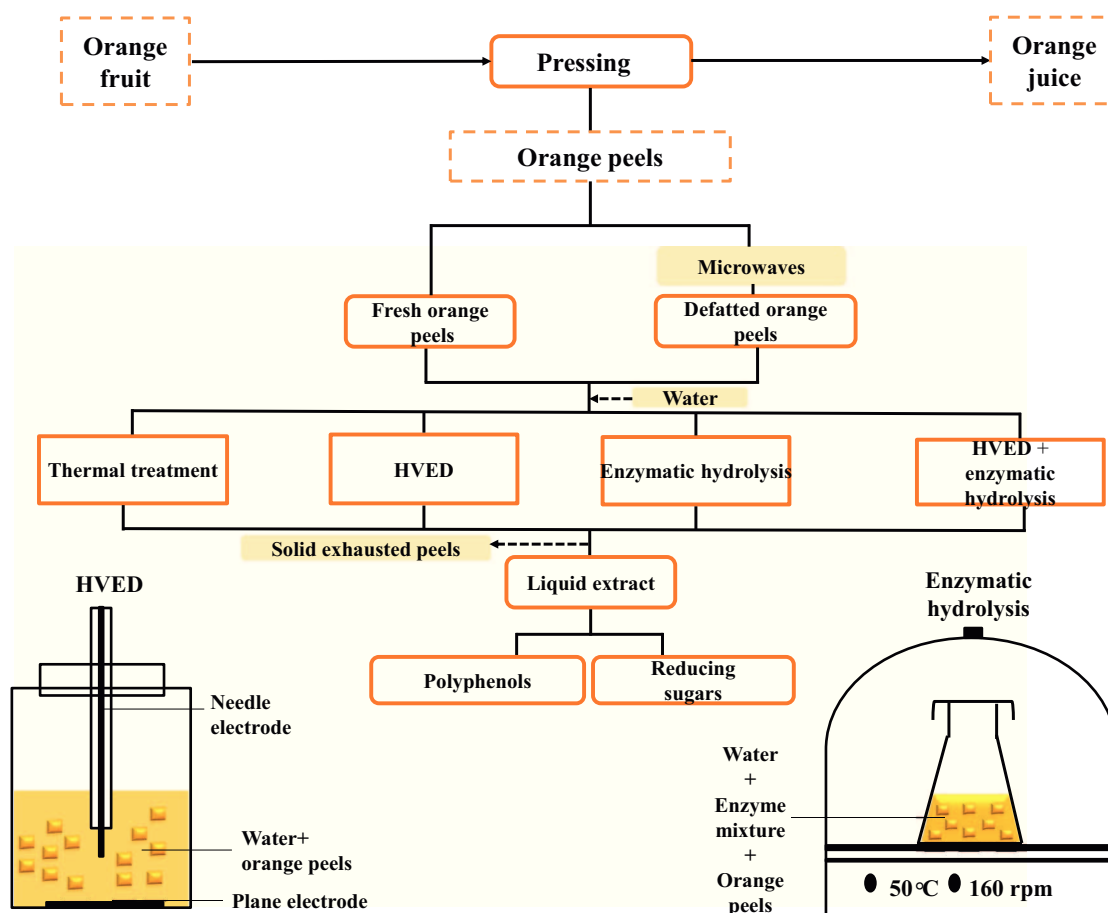


Fig. 1. Experimental setup.

2.2.5.3. Application of HVED on enzymes. To check if HVED stimulated the activity of the enzymes, the enzymatic solution was treated with HVED prior to orange peels addition. Viscozyme® L at the concentration of 12 fungal β -Glucanase Units (FBGU)/g of orange peel was added to water (160 g at 50 °C). HVED (0 to 300 kJ/kg) were applied on the enzymatic solution. Then, orange peels were added to the pretreated enzymatic solution and the diffusion was conducted at 50 °C, pH of 4.5 for 180 min.

2.2.6. Cell disintegration index, Z

Cell disintegration index, Z, was used to evaluate the efficiency of HVED and enzymatic hydrolysis for the release of solutes in comparison with control procedure (thermal treatment at 50 °C). The conductivity was measured in the liquid medium. Cell disintegration index, Z, was calculated according to Eq. (3):

$$Z = \frac{\sigma - \sigma_u}{\sigma_d - \sigma_u} \quad (3)$$

where σ is the actual electrical conductivity, σ_u is the electrical conductivity of the untreated peels (control procedure), and σ_d is the electrical conductivity of the completely damaged orange peels obtained by grinding.

2.3. Analysis

2.3.1. Reducing sugars content

The concentration of reducing sugars was determined by means of the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS reagent) method (Miller, 1959). 1 mL of DNS (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) was added to 0.5 mL of the extract. After homogenization, the mixture was brought to 100 °C for 5 min, then to –20 °C for 4 min. Under alkaline conditions,

3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) is reduced to 3-amino,5-nitrosalicylic acid. The absorbance was measured at 540 nm by the UV–Vis spectrophotometer (Thermo Spectronic Genesys 20, Thermo Electron Corporation, MA, USA). Glucose (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) was used for the calibration curve.

2.3.2. Total polyphenol content

The Folin-Ciocalteu colorimetric method was used to determine the amount of total polyphenols extracted from orange peels (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventos, 1999). The extract (0.2 mL) was mixed with 1 mL of ten-fold diluted Folin–Ciocalteu reagent (Merck, Darmstadt, Germany). Then 0.8 mL of sodium carbonate (Na_2CO_3) (75 g/L) (Prolabo, France) was added. After 10 min of incubation at 60 °C, the sample was cooled at room temperature. The absorbance was measured at 750 nm by the UV–Vis spectrophotometer. Gallic acid (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) was used for the calibration curve. The results were expressed as g of Gallic acid equivalent (GAE) per 100 g of dry matter (g GAE/100 g DM).

2.3.3. Size distribution

The effect of HVED on the fragmentation of orange peels was shown by the determination of particle size. Suspensions of orange peels obtained after HVED treatments with different energy inputs: 44, 222 and 448 kJ/kg were studied using a laser granulometer (Malvern Mastersizer 2000, Malvern, Orsay, France).

2.3.4. Effective diffusivity of polyphenols and reducing sugars

Polyphenols or reducing sugars diffusivity was studied by using Fick's second law. Orange peels particles were considered as spherical after their treatment with HVED. The solution of Fick's second law for a

well-stirred solution of limited volume is given in Eq. (4) (Crank, 1979):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2\alpha(\alpha + 1) \exp(-Dq_n^2 t/l^2)}{1 + \alpha + q_n^2 \alpha^2} \quad (4)$$

where M_t is the reducing sugar or polyphenol concentration in the extract after time t , M_∞ is the maximal concentration of reducing sugar or polyphenol after an infinite time, α , is the liquid/solid ratio (2.72), D is the coefficient of diffusion (m^2/s), a is the radius of the sample (0.001 m), $n = 5$, $q_1 = 3.465$, $q_2 = 6.4736$, $q_3 = 9.5567$, $q_4 = 12.6668$ and $q_5 = 15.7888$.

2.3.5. Initial rate of enzymatic reaction

The initial rate of enzymatic reaction for the extraction of sugars and polyphenols was calculated according to Eq. (5):

$$V_i = \frac{d[P]}{dt} \quad (5)$$

where $\frac{d[P]}{dt}$ is the slope of the tangent at the origin, P is the concentration of the extractive compound (sugars or polyphenols in mg/mL) and t is the time of enzymatic hydrolysis in min.

2.4. Statistical analysis

All experiments and measurements were repeated at least three times. Means and standard deviations of data were calculated. The error bars presented on the figures correspond to the standard deviations.

3. Results and discussion

3.1. Cell damage of orange peels by HVED and enzymatic hydrolysis

Fig. 2 represents the variation of the cell disintegration index Z as a function of time for different treatments (HVED and enzymatic hydrolysis) from fresh and defatted orange peels (using MW), compared to

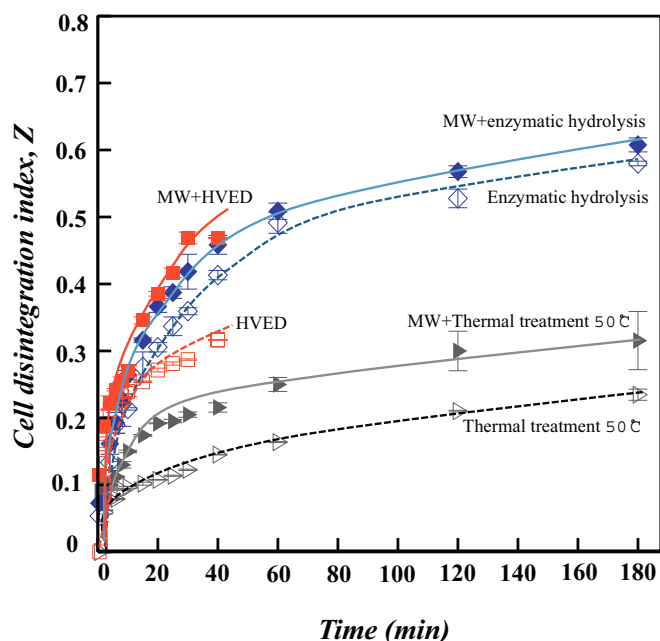


Fig. 2. Electrical conductivity disintegration index, Z , as a function of time for different treatments of orange peels: \blacktriangleright Thermal treatment of fresh peels, \blacktriangleright Thermal treatment of defatted peels, \square High voltage electrical discharges treatment of fresh peels (0 to 40 min which correspond to the energy input between 0 and 900 kJ/kg), \blacksquare High voltage electrical discharges treatment of defatted peels (0 to 40 min), \diamond Enzymatic hydrolysis of fresh peels, \blacklozenge Enzymatic hydrolysis of defatted peels (12 fungal β -Glucanase Units (FBGU)/g of orange peel).

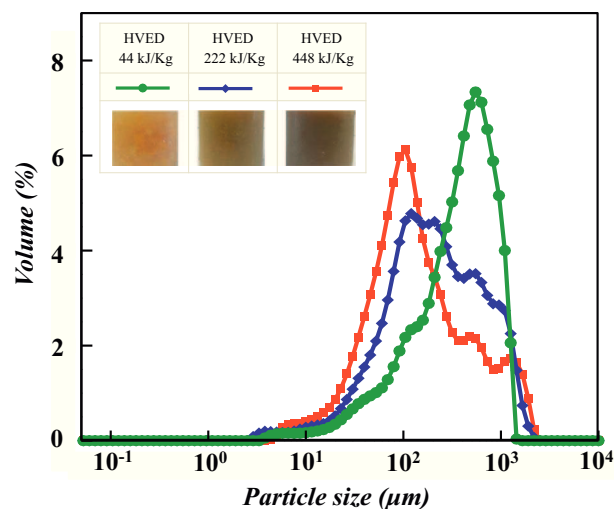


Fig. 3. Volume of orange peels as a function of particle size, after different high voltage electrical discharges pretreatments: \bullet 44 kJ/kg, \blacklozenge 222 kJ/kg and \blacksquare 448 kJ/kg. Insert presents the effect of high voltage electrical discharges energy input on the fragmentation of orange peels.

the control (thermal treatment). For all experiments, the values of Z were higher for defatted orange peels compared to those from fresh peels. The elevation of temperature and internal pressure in the cell walls during MW pretreatment, accelerates the rupture of cells which leads to higher values of Z (Ahmad & Langrish, 2012). Moreover, the values of Z for the defatted peels were higher with HVED (0.47) and enzymatic hydrolysis (0.45) compared to the control (0.21) after 40 min. This result shows the effectiveness of electrical and biological treatments in damaging the cellular structures and extracting the ionic intracellular components. During enzymatic hydrolysis, the enzymes hydrolyze the mesocarp tissue of orange peels and thus facilitate the liberation of biomolecules (Vergara-Barberán, Mompó-Roselló, Lermaga-García, Herrero-Martínez, & Simó-Alfonso, 2017). During HVED, the fragmentation of particles improves the extraction of biomolecules. The values of Z increase gradually with the duration of discharges. This is related to the extraction of intracellular components from damaged cells. The high extraction rates of HVED are related to the phenomenon of fragmentation that occurs during the treatment. Fig. 3 shows the particle size distribution of orange peels after HVED treatment at different energy inputs. The cell walls disruption and fragmentation of orange peels after HVED was detected visually. Initially, orange peels were squares of 1 cm^2 . After HVED treatments, these squares were fragmented and turned into a powder at high energy inputs. Thus, the product fragmentation during HVED treatment can be controlled by the number of pulsed discharges. Increasing the HVED energy input from 44 to 448 kJ/kg decreased more than ten folds orange peels particle size, which improved the diffusion kinetics of biomolecules. The pretreatment of grape seeds by HVED has clearly fragmented the seeds and has reduced their size twenty folds (Boussetta et al., 2012). The fragmentation of particles results from the development of cavitation bubbles and shock waves during HVED treatment (Boussetta & Vorobiev, 2014). Electrical discharges generated in water caused the disruption of cell membranes and the fragmentation of orange peels, which enhanced the release of intracellular compounds.

3.2. Extraction of reducing sugars and polyphenols

Fig. 4 presents the kinetics of reducing sugars and polyphenols extraction as a function of HVED energy inputs. Varying the HVED energy input from 44 to 222 kJ/kg increased the reducing sugars and polyphenols yields up to 19% and 0.7% respectively from defatted orange peels. MW pretreatment used for peels defatting, improved the

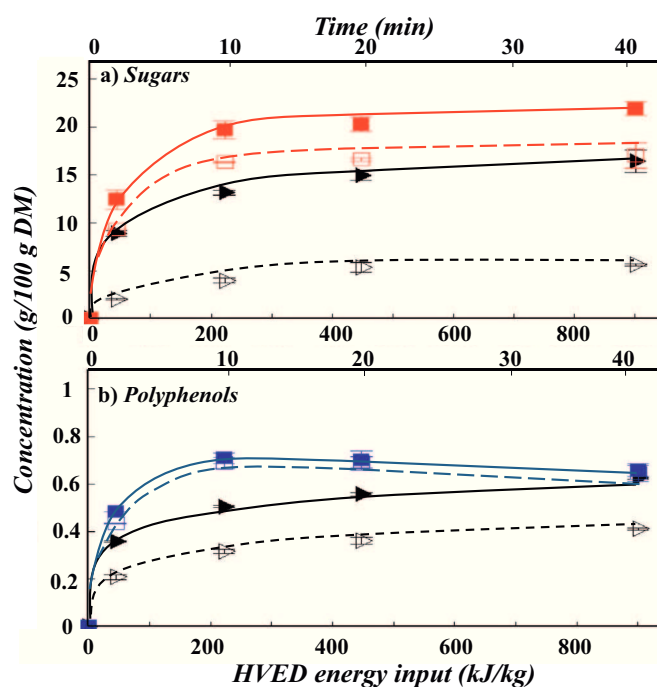


Fig. 4. Extraction kinetics of reducing sugars (a) and polyphenols (b) as a function of high voltage electrical discharges energy inputs for different treatments of orange peels: \triangleright Thermal treatment of fresh peels, \blacktriangleright Thermal treatment of defatted peels, \square High voltage electrical discharges treatment of fresh peels, \blacksquare High voltage electrical discharges treatment of defatted peels.

subsequent HVED-assisted extraction of reducing sugars and polyphenols. This is likely to occur since, MW radiation weakens the cell wall matrices, which facilitates the extraction of intracellular components (Kratchanova, Pavlova, & Panchev, 2004; Maran et al., 2013). For energy values above 222 kJ/kg, sugars yield remained constant but polyphenols yield slightly decreased from 0.7% to 0.65%. The decrease in polyphenols contents beyond an optimum energy input was also observed on grape pomace (Boussetta et al., 2011) and grape seeds (Liu et al., 2011). The negative effect of HVED at high energy inputs was attributed to the production of oxidizing species like hydroxyl radicals, atomic hydrogen and ozone (Rajha, Boussetta, Louka, Maroun, & Vorobiev, 2015b). These species may oxidize and damage the extracted polyphenols, in particular for a high number of discharges. The effects of HVED on polyphenols stability were demonstrated using model solutions containing catechin and epicatechin. It was demonstrated that the degradation of polyphenols during HVED treatment is affected by the initial pH of the solution. Faster and higher degradation rate of catechin and epicatechin is achieved at high pH. The degradation of catechin was also related to the formation of ozone during HVED treatment. When ozone reacts with water molecules, hydrogen peroxide is formed and then decomposed to form hydroxyl radicals (Boussetta et al., 2011). The mechanism of degradation of polyphenols during HVED treatment was also explained by the formation of intermediate oxidative products. The hydroxyl radical reacts with phenol, resulting in the formation of phenoxyl radical, that can also be formed under the action of ultraviolet light produced by the discharge. The phenoxyl radical reacts with hydroxyl radical or oxygen to form intermediate oxidative products such as pyrocatechol, hydroquinone, resorcinol and 1,4-benzoquinone or other products (Chen, Zhang, Dai, & Yuan, 2004).

Flavonoids are the main polyphenols present in citrus peels. The citrus flavonoids include a class of glycosides, namely, hesperidin, naringin and eriocitrin and another class of O-methylated aglycones of flavones such as nobiletin and tangeretin (Luengo et al., 2013; Rafiq et al., 2016). A previous study showed that hesperidin is the major flavonoid of orange peels (El Kantar et al., 2017). Flavonoids have

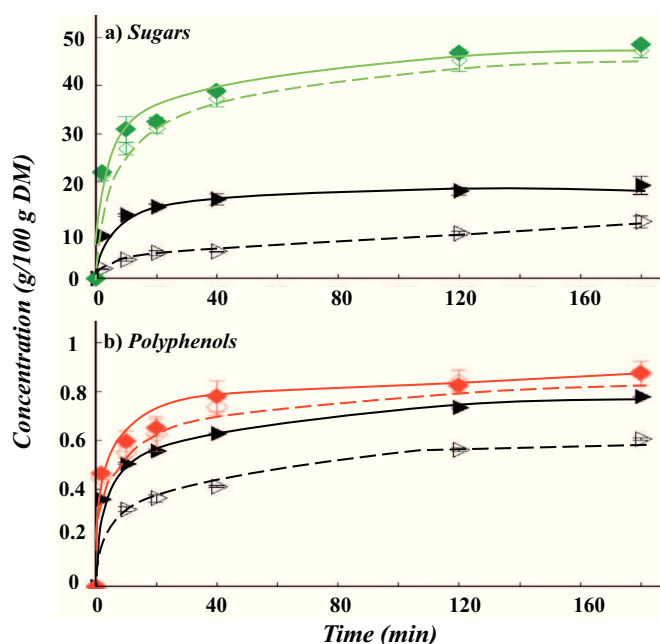


Fig. 5. Extraction kinetics of reducing sugars (a) and polyphenols (b) as a function of time for different treatments of orange peels: \triangleright Thermal treatment of fresh peels, \blacktriangleright Thermal treatment of defatted peels, \diamond Enzymatic hydrolysis from fresh peels, \blacklozenge Enzymatic hydrolysis from defatted peels.

different structures and differ by their degree of hydroxylation and polymerization (Kumar & Pandey, 2013). Thus, it will be interesting in a further study, to evaluate if HVED and enzymatic hydrolysis could affect the extraction of selective flavonoids.

Fig. 5 shows the effect of enzymatic hydrolysis on the extraction of reducing sugars and polyphenols from orange peels. Yields of reducing sugars and polyphenols extracted from defatted orange peels, reached 48% and 0.85% respectively after 180 min of enzymatic hydrolysis. Viscozyme[®] L decomposed the cell wall of orange peels to release biomolecules. This mixture of enzymes has already shown its effectiveness on the extraction of flavonoids from Korean citrus peels (Ahn et al., 2005) and total polyphenols from unripe apples (Zheng et al., 2009). Compared to HVED that permitted a high extraction of polyphenols (Fig. 4), enzymatic hydrolysis allowed a higher and more intense extraction of sugars. Viscozyme[®] L hydrolyzed polysaccharides into sugars that can be fermented to produce ethanol. Enzymatic hydrolysis permitted almost the same extraction of polyphenols for a duration 17 times higher. For this reason, a combination of the two treatments was used to extract both polyphenols and reducing sugars in higher yields and shorter time.

Fig. 6 shows the effect of applying HVED prior to enzymatic hydrolysis on the extraction kinetics of reducing sugars and polyphenols from defatted orange peels. Treatment of orange peels with 3 different energy values of HVED: 44, 222 and 448 kJ/kg prior to enzymatic hydrolysis, enhanced the kinetics of extraction compared to enzymatic hydrolysis. Curves representing the extraction kinetics of reducing sugars and polyphenols for HVED energy input of 222 kJ/kg and 448 kJ/kg are superposed. After about 2 min of enzymatic hydrolysis, the maximum yields of reducing sugars and polyphenols were reached when a HVED pre-treatment was applied. This maximum extraction yield was higher with a HVED treatment of 222 kJ/kg compared to 44 kJ/kg. This result shows that HVED accelerated the liberation of biomolecules during the subsequent enzymatic hydrolysis due to the fragmentation of orange peels, thus increasing the surface accessibility for enzymes. Hence, HVED pretreatment improves the accessibility of substrates to enzymes. Moreover, HVED pretreatment of orange peels is considered to be a “green” technology that replaces chemical or other

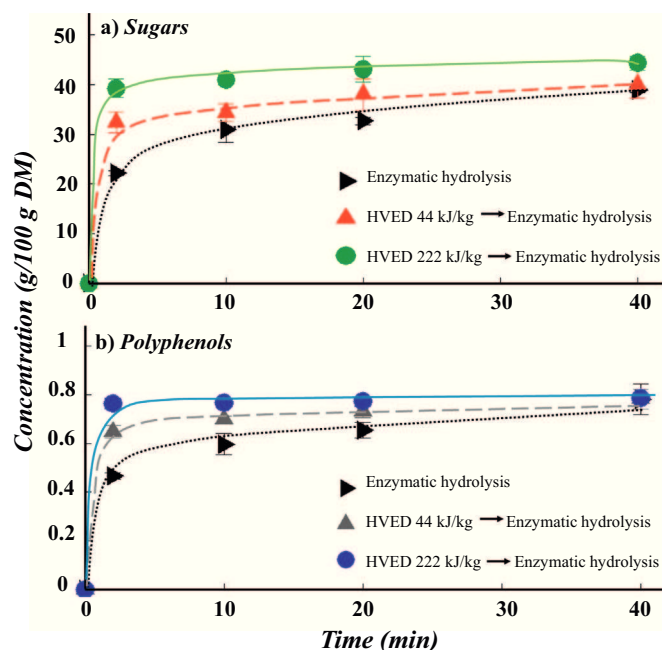


Fig. 6. Extraction kinetics of reducing sugars (a) and polyphenols (b) as a function of the time of enzymatic hydrolysis for different pretreatments from defatted orange peels.

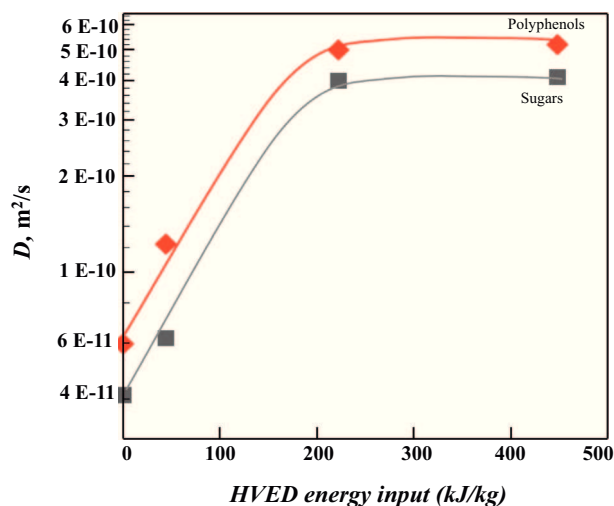


Fig. 7. Diffusion coefficients of polyphenols and reducing sugars during enzymatic hydrolysis as a function of high voltage electrical discharges energy inputs (0 to 448 kJ/kg).

physical pretreatments. Chemical pretreatments such as acid hydrolysis can be hazardous for the environment (Su, Tan, & Xu, 2016). Physical pretreatments like steam explosion require high temperatures (above 150 °C) and significant amounts of energy. The main benefits of HVED are low energy requirements, high extraction rate, low temperature increase due to the treatment and eco-friendly characteristics.

3.3. Diffusivity of reducing sugars and polyphenols

Fig. 7 shows the diffusivities D (m^2/s) of reducing sugars and polyphenols during enzymatic hydrolysis after HVED treatment (0 to 448 kJ/kg). The treatment of orange peels with HVED enhanced the diffusivities of reducing sugars and polyphenols as compared to untreated samples (0 kJ/kg). This is in concordance with Fig. 6. Yields of polyphenols and reducing sugars increased with increasing energy inputs of HVED.

The diffusivities of polyphenols and reducing sugars from the

untreated orange peels were respectively $6 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ and $4 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$. The HVED energy of 222 kJ/kg, gave extraction diffusivities of 4×10^{-10} and $5 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ for reducing sugars and polyphenols respectively. Beyond this energy, diffusivities were nearly constant. The HVED energy of 222 kJ/kg is therefore sufficient to enhance reducing sugars and polyphenols diffusivities during the subsequent enzymatic hydrolysis. A similar trend was observed on flaxseed cake. The HVED pretreatment of flaxseed cake before hydro-ethanolic extraction enhanced the diffusivity of polyphenols from $5.9 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ to $4.2 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ (Boussetta & Vorobiev, 2014). HVED have also affected the diffusivities of polyphenols ($9.14 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$) and proteins ($1.5 \times 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$) from vine shoots at an HVED energy input of 254 kJ/kg (Rajha et al., 2014). Diffusivities of biomolecules from orange peels were lower than those obtained for flaxseed cake, but higher than those obtained for vine shoots. This could be explained by the difference in the structure and the resistance of the raw material. Moreover, polyphenols diffusivities from vine shoots were higher than proteins diffusivities, since the diffusion capacity of molecules depends on the solvent's diffusion and solute's solubility.

3.4. Effect of HVED on the enzymatic activity

The effect of HVED treatment on the enzymatic activity was studied by subjecting the enzymatic solution to HVED (0 to 300 kJ/kg) prior to orange peels addition. Fig. 8 shows the concentration of reducing sugars and polyphenols after 20 min and 180 min of enzymatic hydrolysis (using pretreated Viscozyme® L with HVED). The kinetics of extraction decreased with an increase of HVED energy input. The yields of reducing sugars and polyphenols decreased from 33% and 0.69% (untreated enzyme) to 25% and 0.53% (enzyme pretreated with HVED 300 kJ/kg) respectively, after 20 min of enzymatic hydrolysis. However, after 180 min of enzymatic hydrolysis, the percentages of extracted molecules are about the same for the untreated and treated enzyme. This result shows that HVED caused a reversible denaturation of the enzyme, which decreased the initial enzymatic rate without deactivating the enzyme (Table 1). The change in pH, induced by HVED, could be responsible for the reversible denaturation of the enzyme. This phenomenon has been explained after the HVED treatment of rapeseed cake. Protein content of the extracts slightly decreased when high HVED energy inputs were used in rapeseed cake. It was attributed to the production of active species during HVED that could oxidize some of the extracted proteins or the possible coagulation of proteins induced by the change in pH during HVED treatment (Barba et al., 2015). In our case, the enzyme was not deactivated by the produced active species because it resumed its activity during enzymatic hydrolysis at its optimal pH.

Fig. 9 shows the effect of the electrical treatment (HVED 222 kJ/kg), applied before or during the biological treatment (enzymatic hydrolysis), on the extraction of reducing sugars and polyphenols. The application of HVED during enzymatic hydrolysis did not improve the extraction of molecules, and the percentages of reducing sugars and polyphenols were equivalent with those of the enzymatic hydrolysis (Fig. 5). In these conditions, HVED didn't stimulate the enzyme activity when applied during enzymatic hydrolysis. However, the application of HVED on orange peels as a pretreatment before enzymatic hydrolysis, improved the kinetics of extraction of biomolecules. The fragmentation of orange peels during HVED, increases the accessibility of enzymes to their substrate, resulting in a better release of biomolecules. Similar results were obtained in the literature. The hydro-ethanolic extraction of polyphenols from flaxseed increased the polyphenols yields from 0.5 mg/g (untreated flaxseed) to 4.3 mg/g (flaxseed pretreated with HVED) after 80 min at 20 °C (Boussetta et al., 2013). The pretreatment of grape seeds with HVED also enhanced the extraction kinetics and the polyphenols yields during hydro-ethanolic diffusion. Polyphenols yields increased from 5 g/100 g (untreated seeds) to 8.6 g/100 g (seeds

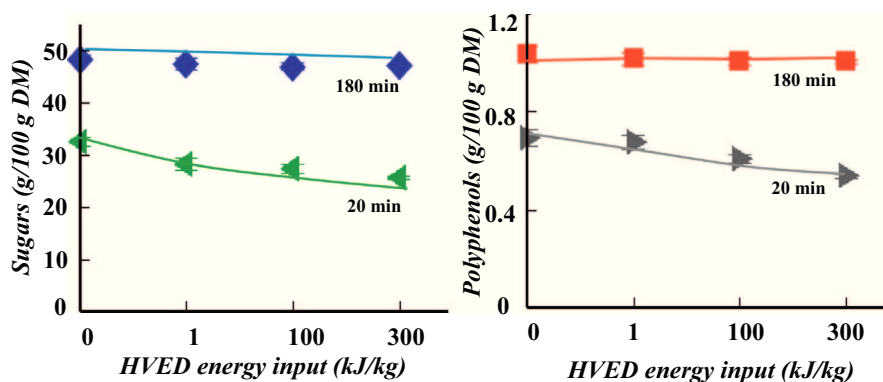


Fig. 8. Yields of polyphenols and reducing sugars obtained after 20 min and 180 min of enzymatic hydrolysis as a function of high voltage electrical discharges energy input.

Table 1

Effect of high voltage electrical discharges (HVED) treatment of the enzyme on the initial rate of enzymatic reaction (mg/mL/min).

Treatment	Enzymatic hydrolysis	HVED treatment of the enzymes then enzymatic hydrolysis		
HVED energy input (kJ/kg)	0	1	100	300
Initial enzymatic rate (mg/mL/min)	6.35	4.84	4.50	3.95
	0.13	0.12	0.11	0.09

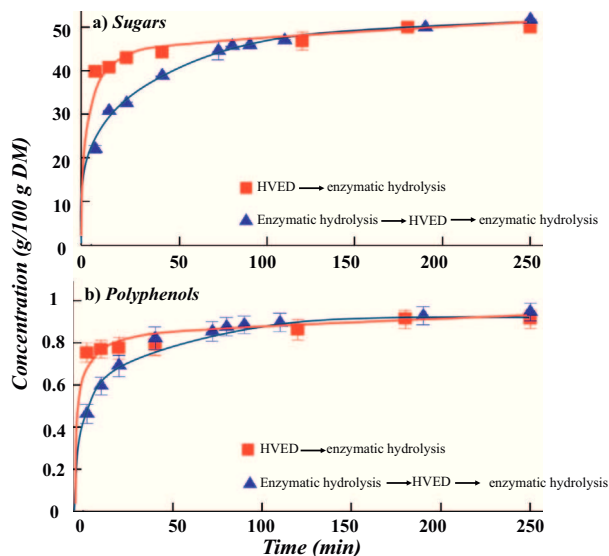


Fig. 9. Extraction kinetics of reducing sugars (a) and polyphenols (b) as a function of the time, for different combinations of high voltage electrical discharges (222 kJ/kg) and enzymatic hydrolysis (12 fungal β -Glucanase Units (FBGU)/g of orange peels).

pretreated with HVED) after 60 min of hydro-ethanolic diffusion at 50 °C (Boussetta et al., 2012). In both cases, the application of HVED could improve the solvent's penetration into cells and the polyphenols extraction.

4. Conclusions

The valorization of orange peels was performed by extracting polyphenols and reducing sugars using high voltage electrical discharges and enzymatic hydrolysis. Orange peels are a good source for biofuel production due to their richness in carbohydrates. The enzyme mixture allowed the hydrolysis of complex sugars and consequently a more intense extraction of fermentable sugars. The application of high

voltage electrical discharges, prior to enzymatic hydrolysis, allowed an intensive extraction of biomolecules with the highest yields of polyphenols and reducing sugars from defatted orange peels. High voltage electrical discharges can be used as a “green” technology to replace chemical, time and energy consuming pretreatments of citrus waste, applied before enzymatic hydrolysis and fermentation. A further purification step can be carried to separate the polyphenols from the fermentable sugars.

Funding

This work was supported by the Lebanese National Council for Scientific Research and Université de Technologie de Compiègne, France.

References

- Ahmad, J., & Langrish, T. A. G. (2012). Optimisation of total phenolic acids extraction from mandarin peels using microwave energy: The importance of the Maillard reaction. *Journal of Food Engineering*, 109(1), 162–174.
- Ahn, S.-C., Kim, M.-S., Lee, S.-Y., Kang, J.-H., Kim, B.-H., Oh, W.-K., ... Ahn, J.-S. (2005). Increase of bioactive flavonoid aglycone extractable from Korean citrus peel by carbohydrate-hydrolyzing enzymes. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(4), 288–294.
- Allaf, T., Tomao, V.r., Ruiz, K., & Chemat, F. (2013). Instant controlled pressure drop technology and ultrasound assisted extraction for sequential extraction of essential oil and antioxidants. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 239–246.
- Almohammed, F., Koubaa, M., Khelifa, A., Nakaya, M., Mhemdi, H., & Vorobiev, E. (2017). Pectin recovery from sugar beet pulp enhanced by high-voltage electrical discharges. *Food and Bioprocess Processing*, 103, 95–103.
- Barba, F. J., Boussetta, N., & Vorobiev, E. (2015). Emerging technologies for the recovery of isothiocyanates, protein and phenolic compounds from rapeseed and rapeseed press-cake: Effect of high voltage electrical discharges. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 31, 67–72.
- Boluda-Aguilar, M., & López-Gómez, A. (2013). Production of bioethanol by fermentation of lemon (*Citrus limon* L.) peel wastes pretreated with steam explosion. *Industrial Crops and Products*, 41, 188–197.
- Bousbia, N., Vian, M. A., Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., & Chemat, F. (2009). A new process for extraction of essential oil from citrus peels: Microwave hydrodiffusion and gravity. *Journal of Food Engineering*, 90(3), 409–413.
- Boussetta, N., Turk, M., De Taeye, C., Larondelle, Y., Lanoisellé, J. L., & Vorobiev, E. (2013). Effect of high voltage electrical discharges, heating and ethanol concentration on the extraction of total polyphenols and lignans from flaxseed cake. *Industrial Crops and Products*, 49, 690–696.
- Boussetta, N., & Vorobiev, E. (2014). Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: A review. *Comptes Rendus Chimie*, 17(3), 197–203.
- Boussetta, N., Vorobiev, E., Deloison, V., Pochez, F., Falcimaigne-Cordin, A., & Lanoisellé, J. L. (2011). Valorisation of grape pomace by the extraction of phenolic antioxidants: Application of high voltage electrical discharges. *Food Chemistry*, 128(2), 364–370.
- Boussetta, N., Vorobiev, E., Le, L. H., Cordin-Falcimaigne, A., & Lanoisellé, J. L. (2012). Application of electrical treatments in alcoholic solvent for polyphenols extraction from grape seeds. *LWT- Food Science and Technology*, 46(1), 127–134.
- Brahim, M., El Kantar, S., Boussetta, N., Grimi, N., Brosse, N., & Vorobiev, E. (2016). Delignification of rapeseed straw using innovative chemo-physical pretreatments. *Biomass and Bioenergy*, 95, 92–98.
- Chemat, F., Rombaut, N., Meullemiestre, A., Turk, M., Perino, S., Fabiano-Tixier, A.-S., & Abert-Vian, M. (2017). Review of green food processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 41, 357–377.

- Chen, Y.-S., Zhang, X.-S., Dai, Y.-C., & Yuan, W.-K. (2004). Pulsed high-voltage discharge plasma for degradation of phenol in aqueous solution. *Separation and Purification Technology*, 34(1–3), 5–12.
- Choi, I. S., Kim, J.-H., Wi, S. G., Kim, K. H., & Bae, H.-J. (2013). Bioethanol production from mandarin (*Citrus unshiu*) peel waste using popping pretreatment. *Applied Energy*, 102, 204–210.
- Choi, I. S., Lee, Y. G., Khanal, S. K., Park, B. J., & Bae, H.-J. (2015). A low-energy, cost-effective approach to fruit and citrus peel waste processing for bioethanol production. *Applied Energy*, 140, 65–74.
- Crank, J. (1979). *The mathematics of diffusion*. Oxford university press.
- El Kantar, S., Boussetta, N., Lebovka, N., Foucart, F., Rajha, H. N., Maroun, R. G., ... Vorobiev, E. (2017). Pulsed electric field treatment of citrus fruits: Improvement of juice and polyphenols extraction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*.
- Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., & Chemat, F. (2007). Comparison of different isolation methods of essential oil from citrus fruits: Cold pressing, hydrodistillation and microwave 'dry' distillation. *Flavour and Fragrance Journal*, 22(6), 494–504.
- Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., Smadja, J., & Chemat, F. (2006). An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. *Journal of Chromatography A*, 1112(1), 121–126.
- Guan, X., & Yao, H. (2008). Optimization of Viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. *Food Chemistry*, 106(1), 345–351.
- Hegazy, A. E., & Ibrahim, M. I. (2012). Antioxidant activities of orange peel extracts. *World Applied Sciences Journal*, 18(5), 684–688.
- Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.-S., Dangles, O., & Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 119(2), 851–858.
- Kratchanova, M., Pavlova, E., & Panchev, I. (2004). The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin. *Carbohydrate Polymers*, 56(2), 181–185.
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *ScientificWorldJournal*, 2013, 162750.
- Lagha-Benamrouche, S., & Madani, K. (2013). Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*, 50, 723–730.
- Li, B. B., Smith, B., & Hossain, M. M. (2006). Extraction of phenolics from citrus peels: II. Enzyme-assisted extraction method. *Separation and Purification Technology*, 48(2), 189–196.
- Liu, D., Vorobiev, E., Savoie, R., & Lanoisellé, J.-L. (2011). Intensification of polyphenols extraction from grape seeds by high voltage electrical discharges and extract concentration by dead-end ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*, 81(2), 134–140.
- Luengo, E., Álvarez, I., & Raso, J. (2013). Improving the pressing extraction of polyphenols of orange peel by pulsed electric fields. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 17, 79–84.
- Maran, J. P., Sivakumar, V., Thirugnanasambandham, K., & Sridhar, R. (2013). Optimization of microwave assisted extraction of pectin from orange peel. *Carbohydrate Polymers*, 97(2), 703–709.
- M'hiri, N., Ioannou, I., Boudhrioua, N. M., & Ghoul, M. (2015). Effect of different operating conditions on the extraction of phenolic compounds in orange peel. *Food and Bioproducts Processing*, 96, 161–170.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.
- Parniakov, O., Barba, F. J., Grimi, N., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2014). Impact of pulsed electric fields and high voltage electrical discharges on extraction of high-added value compounds from papaya peels. *Food Research International*, 65, Part C, 337–343.
- Putnik, P., Bursac Kovacevic, D., Rezek Jambrak, A., Barba, F. J., Cravotto, G., Binello, A., ... Shpigelman, A. (2017). Innovative "green" and novel strategies for the extraction of bioactive added value compounds from citrus wastes-A review. *Molecules*, 22(5).
- Rafiq, S., Kaul, R., Sofi, S., Bashir, N., Nazir, F., & Nayik, G. A. (2016). Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*.
- Rajha, H. N., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, R. G., & Vorobiev, E. (2014). A comparative study of physical pretreatments for the extraction of polyphenols and proteins from vine shoots. *Food Research International*, 65, 462–468.
- Rajha, H. N., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, R. G., & Vorobiev, E. (2015a). Effect of alternative physical pretreatments (pulsed electric field, high voltage electrical discharges and ultrasound) on the dead-end ultrafiltration of vine-shoot extracts. *Separation and Purification Technology*, 146, 243–251.
- Rajha, H. N., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, R. G., & Vorobiev, E. (2015b). Electrical, mechanical, and chemical effects of high-voltage electrical discharges on the polyphenol extraction from vine shoots. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 31, 60–66.
- Rezzadori, K., Benedetti, S., & Amante, E. R. (2012). Proposals for the residues recovery: Orange waste as raw material for new products. *Food and Bioproducts Processing*, 90(4), 606–614.
- Rezzoug, S.-A., & Louka, N. (2009). Thermomechanical process intensification for oil extraction from orange peels. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(4), 530–536.
- Rivas, B., Torrado, A., Torre, P., Converti, A., & Dominguez, J. M. (2008). Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(7), 2380–2387.
- Sahraoui, N., Vian, M. A., El Maataoui, M., Boutekedjiret, C., & Chemat, F. (2011). Valorization of citrus by-products using microwave steam distillation (MSD). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(2), 163–170.
- Satari, B., & Karimi, K. (2018). Citrus processing wastes: Environmental impacts, recent advances, and future perspectives in total valorization. *Resources, Conservation and Recycling*, 129, 153–167.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.
- Su, H., Tan, F., & Xu, Y. (2016). Enhancement of biogas and methanization of citrus waste via biodegradation pretreatment and subsequent optimized fermentation. *Fuel*, 181, 843–851.
- Vergara-Barberán, M., Mompó-Roselló, Ó., Lerma-García, M. J., Herrero-Martínez, J. M., & Simó-Alfonso, E. F. (2017). Enzyme-assisted extraction of proteins from citrus fruits and prediction of their cultivar using protein profiles obtained by capillary gel electrophoresis. *Food Control*, 72, Part A, 14–19.
- Widmer, W., Zhou, W., & Grohmann, K. (2010). Pretreatment effects on orange processing waste for making ethanol by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*, 101(14), 5242–5249.
- Zheng, H.-z., Hwang, I.-W., & Chung, S.-K. (2009). Enhancing polyphenol extraction from unripe apples by carbohydrate-hydrolyzing enzymes. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 10(12), 912–919.
- Zou, Z., Xi, W., Hu, Y., Nie, C., & Zhou, Z. (2016). Antioxidant activity of citrus fruits. *Food Chemistry*, 196, 885–896.

3.2. Extraction des molécules bioactives à partir des peaux d'agrumes avec les infrarouges

Après avoir testé différentes technologies électriques et combiner plusieurs traitements pour la valorisation des coproduits d'agrumes, une nouvelle méthode d'extraction avec les Infrarouges (IR) a été utilisée. Le système d'extraction a été mis au point et breveté au Centre d'Analyses et de Recherches de la Faculté des Sciences. A notre connaissance, l'application des IR pour l'extraction des polyphénols des coproduits d'agrumes n'a pas été encore décrite dans la littérature. Le système d'extraction est simple et peu coûteux. L'extraction assistée par les infrarouges est caractérisée par le chauffage direct du solvant, d'où la courte durée d'extraction. Dans une première étude, cette méthode d'extraction a été testée et comparée avec l'extraction solide-liquide conventionnelle pour la libération des polyphénols à partir des peaux d'agrumes. Les deux méthodes d'extraction ont été optimisées et l'activité biologique des polyphénols extraits a été testée. Dans une deuxième étude, l'effet du prétraitement par les IR sur l'amélioration de la quantité et la qualité des polyphénols extraits avec les US, a été étudié. La meilleure combinaison en termes de consommation d'énergie et des rendements d'extraction a été sélectionnée.

3.2.1. Extraction des polyphénols à partir des peaux d'oranges avec les infrarouges : étude de leur effet antifongique.

L'article «Infrared-assisted extraction of phenolic compounds from blood orange peels, their effects on the growth of *Aspergillus flavus* and the production of aflatoxin B1 » a été soumis dans le journal «Food Chemistry» en 2018. Cet article compare l'extraction solide-liquide conventionnelle avec le traitement avec les infrarouges, pour l'extraction des polyphénols à partir des peaux d'oranges.

3.2.1.1. Résumé de l'article

Cette étude a pour but d'optimiser simultanément l'extraction assistée par les infrarouges, des polyphénols et de leur activité antiradicalaire à partir des peaux d'oranges. L'extraction assistée par les infrarouges est comparée avec l'extraction solide-liquide conventionnelle qui a été aussi optimisée. La méthodologie de surface de réponse est adoptée pour étudier l'effet des combinaisons entre les différents paramètres d'extraction.

Les peaux d'oranges sanguines sont utilisées comme matière première. Des mélanges hydroéthanoliques sont utilisés comme solvant. Deux plans d'expérience composites centrés sont conçus pour l'optimisation de l'extraction des polyphénols à partir des peaux d'oranges. Les variables indépendantes sont le pourcentage en éthanol-eau (%), le temps (t) et la température (T). Pour l'extraction solide-liquide, le pourcentage en éthanol-eau est varié entre 39% et 90%, le temps d'extraction entre 1,3 h et 4,6 h et la température entre 29°C et 80°C. Pour l'extraction avec les infrarouges, le pourcentage en éthanol-eau est varié entre 1% et 68%, le temps de traitement entre 0,2 h et 1,8 h et la température entre 29°C et 80°C. Dans les deux cas, le ratio liquide-solide est fixé à 8. Les trois variables sont codées à 5 niveaux $\{-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha\}$. Chaque plan composite centré ($2^3 +$ étoiles) résulte en vingt points expérimentaux dont six répétitions au centre. En fonction de ces paramètres, deux réponses sont étudiées : la concentration en polyphénols totaux et le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH.

Il est important de trouver un compromis entre les concentrations en polyphénols extraits et leur bioactivité. Pour cette raison, il est nécessaire d'étudier et d'optimiser simultanément les deux réponses (polyphénols totaux et % d'inhibition du DPPH) affectées par la combinaison des trois paramètres expérimentaux. L'optimisation multi-réponse de l'extraction SL conventionnelle a donné 1,67 g/ 100 g MS de polyphénols avec un pourcentage d'inhibition du DPPH de 59,4%. Cet optimum a été trouvé avec 79% d'éthanol, pendant 4 h à 73°C. Cependant, avec les infrarouges, un rendement plus élevé en polyphénols (1,97 g/100 g MS) avec un pourcentage d'inhibition du DPPH de 58,5% ont été obtenus avec 51% d'éthanol à 79°C et pour une durée de traitement 4 fois inférieure à celle de l'extraction SL conventionnelle. L'exactitude du modèle a été vérifiée en répétant les conditions optimales pour l'optimisation de la concentration en polyphénols totaux et du pourcentage d'inhibition du DPPH à la fois, avec les deux méthodes d'extraction.

Finalement, les polyphénols extraits dans les conditions optimales avec les infrarouges et l'extraction SL ont été testés contre la croissance du champignon *Aspergillus flavus* et la production d'aflatoxine par ce même champignon. Les polyphénols obtenus avec l'extraction SL et les IR ont inhibé la croissance du champignon de 11,8% et de 15,8% respectivement, et la production d'Aflatoxine B1 de 99,4% et 98,9% respectivement. Les polyphénols présents dans les peaux d'oranges sanguines sont donc des inhibiteurs spécifiques de la biosynthèse de l'aflatoxine B1 plutôt que des inhibiteurs de la croissance du champignon. Ceci est intéressant, car la présence

du champignon incapable de produire la mycotoxine, permettra d'éviter la contamination des aliments par d'autres agents microbiens producteurs d'autres toxines. Les polyphénols extraits, pourront donc être utilisés contre la production de mycotoxines, pour la conservation des aliments.

3.2.1.2. Article: Infrared-assisted extraction of phenolic compounds from blood orange peels, their effects on the growth of *Aspergillus flavus* and the production of aflatoxin B1

(Voir le manuscrit qui suit)

Infrared-assisted extraction of phenolic compounds from blood orange peels, their effects on the growth of *Aspergillus flavus* and the production of aflatoxin B1

Abstract

The extraction of phenolic compounds (PC) from orange peels was optimized by conventional solid-liquid (SL) extraction and innovative infrared-assisted extraction (IRAE). Response surface methodology allowed the optimization of ethanol concentration, time, and temperature in terms of extracted PC and their inhibition percentage of the free radical DPPH, for both SL extraction and IRAE. For SL extraction, the simultaneous optimums of PC and inhibition percentage were respectively 1.67 g/100 g DM and 59.4% obtained after 4 h, at 73 °C with 79% ethanol/water. With IRAE, 1.97 g/100 g DM of PC with 58.5% of inhibition of the free radical were the optimum values reached with 51% ethanol/water after less than 1 h at 79 °C. HPLC analysis showed different quantity and diversity of extracted phenolic compounds. Extracts of simultaneous optimums obtained after SL extraction and IRAE were tested to evaluate the growth of *Aspergillus flavus* and the production of aflatoxin B1.

Keywords: Orange peels; phenolic compounds; infrared-assisted extraction; solid-liquid extraction; optimization; response surface methodology, Aflatoxin B1

1. Introduction

In recent years, researches have focused on the extraction of natural antioxidants from plants and their byproducts (Khan, Abert-Vian, Fabiano-Tixier, Dangles, & Chemat, 2010). Phenolic compounds are known for their antioxidant activities. Epidemiological studies have shown that they decrease the risks of human diseases related to oxidative stress (Chen, Chu, Chyau, Chu, & Duh, 2012; Pandey & Rizvi, 2009). They have cardio protective (Kumar, Sharma, Sharma, & Pandey, 2012), anti-cancer (Wang, Zhang, Yang, & Chen, 2008), antidiabetic (Rizvi & Abu Zaid, 2001) and neuroprotective effects (Nurk et al., 2009). Moreover, in food industries, they prevent the rancidity of oils and fats (Zia-ur-Rehman, 2006) and can inhibit the fungal growth and subsequent mycotoxin production in stored grains (Selvi, Joseph, & Jayaprakasha, 2003).

Aflatoxins (B1, B2, G1, G2) are toxic secondary metabolites produced by especially two filamentous fungi *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) and *Aspergillus parasiticus*. Under favorable conditions of humidity and temperature, these fungi grow on certain foods and feeds like corn, peanuts, cottonseed and cereals, resulting in aflatoxins production (Verheecke, 2014). Fungal infection can occur at a pre- or post-harvest stage of cereal production. Aflatoxin B1 (AFB1) is the most potent and toxic aflatoxin. It is mutagenic, carcinogenic, teratogenic and immunodepressive agent (Kohiyama et al., 2015). Humans and animals are exposed to this mycotoxin through ingestion, skin contact and inhalation (El Khoury et al. 2008). Pesticides are usually used to protect crops from the development of fungi. However synthetic fungicide residues have also toxic effects and pathogens can develop resistance to it. For this reasons interest in the use of natural antimicrobials such as essential oils and phenolic compounds is growing (Bluma, Amaiden, Daghero, & Etcheverry, 2008).

Citrus (from Rutaceae family) is an important world fruit crops (Rafiq et al., 2016). The health benefits of this fruit are mainly related to the presence of bioactive compounds, such as phenolic compounds, vitamin C and carotenoids (Guimarães et al., 2010). After consuming citrus fruits as fresh produce or juice, a large amount of peels is discarded as waste (Londoño-Londoño et al., 2010), dedicated for animal feed (De Moraes Barros, De Castro Ferreira, & Genovese, 2012), or used for fuel production (Li, Smith, & Hossain, 2006). The extraction of phenolic compounds from citrus peels is attracting more and more attention due to their use as natural antioxidants and antimicrobials (Anagnostopoulou, Kefalas, Papageorgiou, Assimopoulou, & Boskou, 2006).

Conventional methods such as solid-liquid extraction, were used for the valorization of citrus peels by the extraction of bioactive compounds (Lou, Lai, Hsu, & Ho, 2016). To improve the yields of extraction and reduce time, newer extraction techniques were used such as microwaves (Farhat et al., 2011), ultrasounds (Khan et al., 2010; Nipornram, Tochampa, Rattanatraiwong, & Singanusong, 2018), accelerated solvent extraction (Nayak et al., 2015) and pulsed electric fields (Luengo, Álvarez, & Raso, 2013). These non-conventional techniques can decrease the extraction time and temperature and reduce the solvent consumption. They can also improve the recovery of bioactive compounds from by-products with low energy consumption (Parniakov, Barba, Grimi, Lebovka, & Vorobiev, 2016).

In this study, a novel method was used for the first time, for the extraction of phenolic compounds from blood orange peels: infrared assisted extraction (IRAE). This simple and low-cost extraction method is based on heating the solvent containing the plant material, with infrared (IR) rays (wavelengths extending from 700 nm to 1 mm) (Chen, Liu, and Chen 2011), to extract phenolic compounds. IR radiation is characterized by its high penetration ability and has found many applications in health care and industrial heating (Qu, Li, Zhang, Zeng, & Fu, 2016).

The purpose of this study was to optimize the extraction of phenolic compounds from blood orange peels, to study their activity on the inhibition of the free radical DPPH and to evaluate their effect on the production of Aflatoxin B1 by *A. flavus*. The recovery of phenolic compounds was conducted by a conventional SL extraction and a novel method IRAE. The optimal ethanol concentration, time, and temperature were determined for each method of extraction. The diversity of the extracted phenolic compounds was also studied.

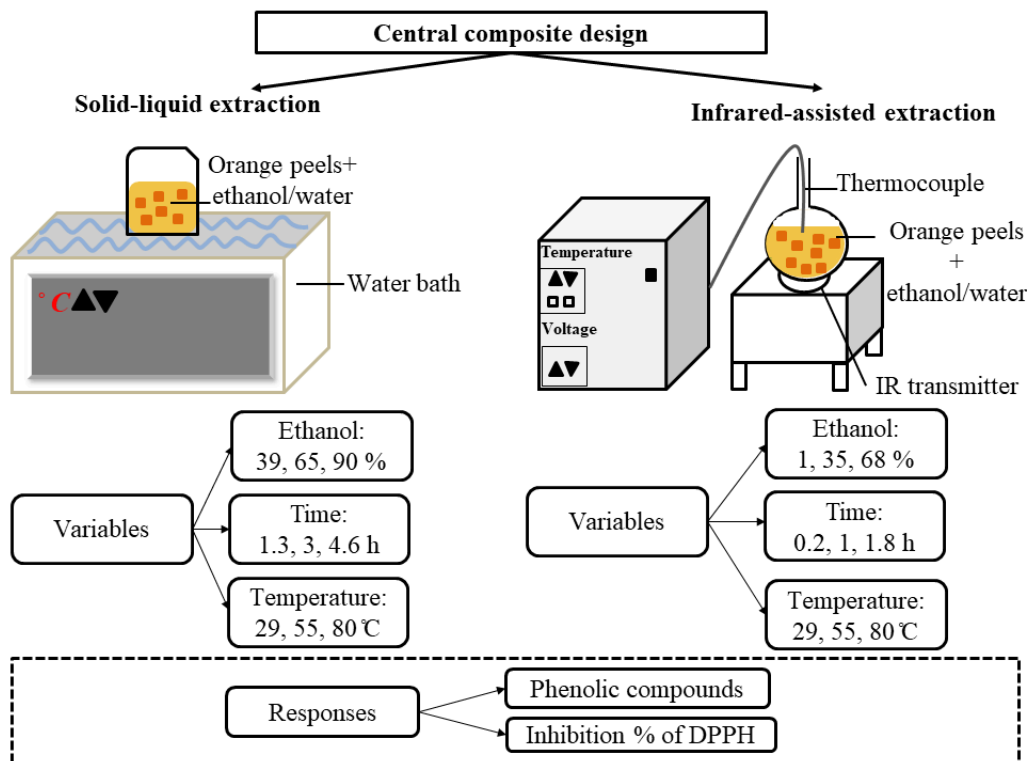


Figure 1. Experimental setup

2. Materials and Methods

2.1. Raw material

Blood orange peels were provided by Balkis Company (Lebanon) and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. Orange peels were manually cut into the similar squares of 1 cm^2 . The moisture content, measured by drying fresh peels at $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ to constant weight, was about 76 %.

2.2. Extraction experiments

2.2.1. Solid-liquid extraction

The solid-liquid extraction of phenolic compounds from orange peels was performed in a water bath with a liquid to solid ratio of 8. Ethanol concentration varied between 39% and 90%, extraction time varied between 1.3 h and 4.6 h and temperature varied between $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, were optimized by response surface methodology (RSM) and the optimal conditions were determined.

2.2.2. Infrared assisted extraction

Orange peels were introduced in a round bottom flask with ethanol/water (liquid to solid ratio: 8). The flask was fixed in a ceramic infrared transmitter for the heating process linked to a PID control and temperature adjustment system. Both the temperature and the voltage can be adjusted (Figure 1). The effect of ethanol concentration (between 1% and 68%), treatment duration (between 0.2 h and 1.8 h) and temperature (between 29 °C and 80 °C) were studied. The optimal conditions for extracting a maximal yield of phenolic compounds with the maximum inhibition percentage of the free radical DPPH were determined. Extracts were obtained by centrifugation at 6000 rpm for 15 min. Supernatants were collected and stored at -20 °C until use.

2.2.3. Experimental designs

Response Surface Methodology method (RSM) was used for the optimization of phenolic compounds extraction from orange peels by two different methods. Independent variables were ethanol-water concentration (%), time (t) and temperature (T). The three variables were coded at 5 levels $\{-\alpha, -1, 0, 1, +\alpha\}$. The central composite design ($2^3 + \text{star}$) resulted of twenty experimental points including six repetitions at the central level. Tables 1 and 2 show the factor values of the three variables and those of the two responses for SL extraction and IRAE respectively. Experimental design and statistical analysis of the results were carried out using STATGRAPHICS Plus 4.0 for Windows.

2.3. Analysis

2.3.1. Total phenolic compounds (PC)

The amount of total phenolic compounds extracted from orange peels was determined by the Folin-Ciocalteu colorimetric method (Singleton, Orthofer, and Lamuela-Raventos, 1999). In this method, 1 mL of ten-fold diluted Folin–Ciocalteu reagent (Scharlau, Spain) was added to 0.2 mL of extract. Then 0.8 mL of sodium carbonate (Na_2CO_3) (75 g/L) (BDH, England) were added. The mixture was incubated at 60 °C for 10 min, and then cooled at room temperature. The absorbance was measured at 750 nm by the UV-Vis spectrophotometer (UV-9200, UK). Gallic acid (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) was used for the calibration curve. The results were expressed as g of gallic acid equivalent (GAE) per 100 grams of dry matter (g GAE/100 g DM).

2.3.2. Inhibition percentage of DPPH

The inhibition percentage of extracted phenolic compounds was measured by the free radical, 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl : DPPH (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995) . This method is based on the reduction of the free radical DPPH by phenolic extracts. 1.45 mL of DPPH (0.06 mM) (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) free radical were added to 50 μ L of orange peels extracts or Trolox (control) (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France). After 30 min of incubation at room temperature, the absorbance was measured at 515 nm. The inhibition percentage of the DPPH free radical is calculated as shown in eq. 1

$$\text{Inhibition Percentage} = [(absorbance\ of\ control - absorbance\ of\ sample)/absorbance\ of\ control] \times 100. \quad (1)$$

2.3.3. High performance liquid chromatography analyses

Gallic acid, resveratrol, quercetin, catechin, caffeic acid, hesperidin, naringin and eriocitrin (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) were used as standards in high performance liquid chromatography (HPLC) analyses, to identify the phenolic compounds in the simultaneous optimums obtained after SL extraction and IRAE. Ultimate 3000 (Dionex, Idstein, Germany) liquid chromatography apparatus coupled to a diode array detector was used. Prior to analyses, the samples and standards were filtered through 0.2 μ m syringe filters (VWR, France). The chromatography column C18 capillary column 100 \times 4.6 mm (Hypersil Gold, Thermo Scientific, USA), was used for all experiments. The temperature of the column was maintained at 40 $^{\circ}$ C. Water-formic acid solution (95:5) (solvent A) and acetonitrile (solvent B) (HPLC grade, Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) were used as solvents. A flow rate of 1 mL/min was applied. The HPLC applied method was as follows: 2%–6% of solvent B in 25 min, 6%–15% of solvent B in 15min, 15%–20% of solvent B in 12 min and 20%–40% of solvent B in 18 min. The injection volume of the sample was 20 μ L.

2.3.4. Antifungal activity

Simultaneous optimums of phenolic compounds extracts from orange peels obtained after SL extraction and IRAE were tested against the growth of a toxinogenic fungi *Aspergillus flavus* and

the toxin secretion of AFB1 from this fungi. *A. flavus* strain NRRL 62477 was used for this purpose.

After the growth of *A. flavus* strain on Czapek yeast extract agar medium (CYA) at 30 °C for 7 days, a spore suspension was prepared. The surface of the prepared culture was scrapped with a sterile Pasteur Pipette (Chase Scientific Glass, Inc., Rokwood, TN, USA) and 8 mL of Tween 80 (0.005%) solution were added. A Neubauer haemocytometer (Superior, Marienfeld, Lauda-Konigshofen, Germany) was used to count the spores. The concentration of spores was adjusted to 10⁶ spore/mL and spore suspension was then kept at 4 °C for further use.

Fungal growth inhibition

A rotavapor was used to evaporate ethanol and concentrate the phenolic compounds tested samples. Phenolic compounds (250 µg) obtained from each SL and IR extracts were added to CYA medium. A final volume of 20 mL was poured in petri dishes. For the control culture, 20 mL of CYA were poured in the dish without phenolic compounds extracts. Then, 10 µL of the previously prepared spore solution (10⁶ spores/mL) were added in the center of each petri dish. The assays were made in triplicate and all the dishes were left 4 days in the incubator at 28 °C. After this incubation period, the growth inhibition of *A. flavus* was determined. The diameters of the cultures were measured and compared to the negative control. The *A. flavus* inhibition percentage was calculated according to eq. 2

$$\text{Inhibition \%} = \frac{(\text{Initial diameter} - \text{Diameter after incubation})}{(\text{Initial diameter})} * 100 \quad (2)$$

AFB1 Extraction and HPLC Analysis

After 7 days of incubation at 28 °C on (CYA) medium, 3 agar plugs (0.5 cm diameter) were removed from different points of the colony for each culture, weighted and placed into 3 mL microtubes. One milliliter of HPLC grade methanol was added to each tube, then the mixture was incubated and shaken for 60 min at room temperature. The mixture was centrifugated for 15 minutes at 13,000 r.p.m (round per minute). Then, the supernatant phase was recuperated and diluted with 11 mL phosphate buffer. The diluted extract was injected into Aflaprep immunoaffinity columns (R-Biopharm, Glasgow, Scotland) using a syringe for purification. An elution was done by adding 1.5 mL of methanol/acetic acid (98:2, v/v) followed by 1.5 mL of HPLC grade water and the total volume was filtered through 0.45 µm filters (Sartorius stedim,

Biotech) then stored at 4 °C before quantification. Aflatoxin B1 quantification was done with a Water Alliance HPLC system using an Utisphere ODB column, C18 (150 × 4.6 mm, 5 μm, 120 Å) (Interchim, Montluçon, France) at 30 °C.

Table 1. RSM central composite design of three factors (real and coded values) and five levels and the experimental responses (PC and inhibition % of DPPH) of SL extraction from orange peels.

Run	Ethanol, (%)		Time, (h)		Temperature, (°C)		PC (g of GAE/100g DM)	Inhibition % of DPPH
	Real value	Coded value	Real value	Coded value	Real value	Coded value		
Factorial Design	50	(-1)	2	(-1)	40	(-1)	1.36	46.04
	80	(+1)	2	(-1)	40	(-1)	1.20	42.45
	50	(-1)	4	(+1)	40	(-1)	1.37	44.24
	80	(+1)	4	(+1)	40	(-1)	1.33	43.50
	50	(-1)	2	(-1)	70	(+1)	1.48	50.52
	80	(+1)	2	(-1)	70	(+1)	1.55	55.01
	50	(-1)	4	(+1)	70	(+1)	1.54	52.17
	80	(+1)	4	(+1)	70	(+1)	1.67	55.75
Center points	65	(0)	3	(0)	55	(0)	1.40	45.59
	65	(0)	3	(0)	55	(0)	1.38	44.69
	65	(0)	3	(0)	55	(0)	1.50	46.49
	65	(0)	3	(0)	55	(0)	1.46	46.93
	65	(0)	3	(0)	55	(0)	1.44	45.29
	65	(0)	3	(0)	55	(0)	1.47	49.77
Star points	39.77	(-α)	3	(0)	55	(0)	1.33	48.88
	90.22	(+α)	3	(0)	55	(0)	1.24	48.06
	65	(0)	1.32	(-α)	55	(0)	1.48	51.27
	65	(0)	4.68	(+α)	55	(0)	1.50	53.29
	65	(0)	3	(0)	29.77	(-α)	1.28	37.64
	65	(0)	3	(0)	80.23	(+α)	1.58	58.74

Table 2. RSM central composite design of three factors (real and coded values) and five levels and the experimental responses (PC and inhibition % of DPPH) of IRAE from orange peels.

Run	Ethanol, (%)		Time, (h)		Temperature, (°C)		PC (g of GAE/100g DM)	Inhibition % of DPPH
	Real value	Coded value	Real value	Coded value	Real value	Coded value		
Factorial Design	15	(-1)	0.5	(-1)	40	(-1)	0.95	34.75
	55	(+1)	0.5	(1)	40	(-1)	1.22	36.06
	15	(-1)	1.5	(+1)	40	(-1)	1.12	47.54
	55	(+1)	1.5	(+1)	40	(-1)	1.30	42.95
	15	(-1)	0.5	(-1)	70	(+1)	1.18	42.79
	55	(+1)	0.5	(-1)	70	(+1)	1.79	54.10
	15	(-1)	1.5	(+1)	70	(+1)	1.54	44.26
	55	(+1)	1.5	(+1)	70	(+1)	1.19	54.39
Center points	35	(0)	1	(0)	55	(0)	1.39	54.10
	35	(0)	1	(0)	55	(0)	1.47	55.90
	35	(0)	1	(0)	55	(0)	1.34	48.85
	35	(0)	1	(0)	55	(0)	1.48	52.95
	35	(0)	1	(0)	55	(0)	1.50	47.38
	35	(0)	1	(0)	55	(0)	1.48	52.62
Star points	1.36	(- α)	1	(0)	55	(0)	1.17	39.34
	68.63	(+ α)	1	(0)	55	(0)	1.52	45.74
	35	(0)	0.16	(- α)	55	(0)	1.27	46.39
	35	(0)	1.84	(+ α)	55	(0)	1.34	51.64
	35	(0)	1	(0)	29.77	(- α)	1.21	36.39
	35	(0)	1	(0)	80.23	(+ α)	1.90	55.57

2. Results and Discussion

Time (t), temperature (T) and ethanol percentage (E) were optimized for the extraction of phenolic compounds from blood orange peels using RSM method. RSM is an effective statistical method for optimization. It permits to evaluate multiple parameters and their interaction with a reduced number of experiments (González-Gómez, Cardoso, Bohoyo, Ayuso, & Delgado-Adamez, 2014). Tables 1 and 2 show the experimental design, where factors are presented in their real and coded values, with their responses (PC and inhibition % of DPPH), respectively for the conventional SL extraction and IRAE. For solid-liquid extraction, phenolic compounds ranged from 1.24% to 1.67% and inhibition percentage from 37.6% and 55.7%. While for IRAE, phenolic compounds ranged from 0.95% to 1.90% and inhibition percentage from 36.1% to 55.9%.

2.1. Solid-liquid extraction

Pareto chart (Figure 2a) shows the positive or negative effects of temperature, time, and ethanol concentration on the extraction of phenolic compounds from orange peels. In the Pareto chart, significant parameters (with a confidence level above 95%) are the histograms that cross the vertical line. According to it, in the rank of variation of parameters, only the variable temperature is significant, and has a positive effect on phenolic compounds extraction. Below Pareto chart, the response surface plot, in its three dimensional illustration, and considering its shape, gives valuable data about the significance of each parameter (Figure 2c). The increase in temperature permitted higher diffusivities of phenolic compounds and improved their mass transfer into the solvent (D'Alessandro, Kriaa, Nikov, & Dimitrov, 2012). Also, high temperatures weaken the membrane structure of the cells, which improve the extraction of biomolecules from orange peels (Li et al., 2006). Phenolic compounds are positively affected by the interaction between ethanol and temperature (E, T). The increase in ethanol percentage while increasing temperature can improve the solubilization of phenolic compounds in their solvent. The synergetic effect between ethanol and temperature enhance the extraction of phenolic compounds from orange peels. However, the phenolic compounds content was negatively affected by the quadratic effect of ethanol (E^2). The increase in ethanol percentage, reduces the dielectric constant of the solvent, which enhances the solubility of phenolic compounds and improves their extraction (Garcia-Castello et al., 2015). From a certain percentage of ethanol, the extraction of phenolic

compounds decreases. Higher ethanol concentration could dehydrate and collapse the vegetable cells, making difficult the diffusion of biomolecules from the plant material to the solvent (Librán, Mayor, Garcia-Castello, & Vidal-Brotons, 2013).

Figure 2 (b and d) shows the Pareto chart and the estimated response surface plot for the inhibition % of DPPH. Similar to PC, the inhibition % of the free radical DPPH is positively affected by temperature and the interaction between ethanol and temperature. Studies have shown the correlation between the presence of phenolic compounds in extracts and the scavenging activity against the DPPH radical (Hegazy & Ibrahim, 2012; Lagha-Benamrouche & Madani, 2013).

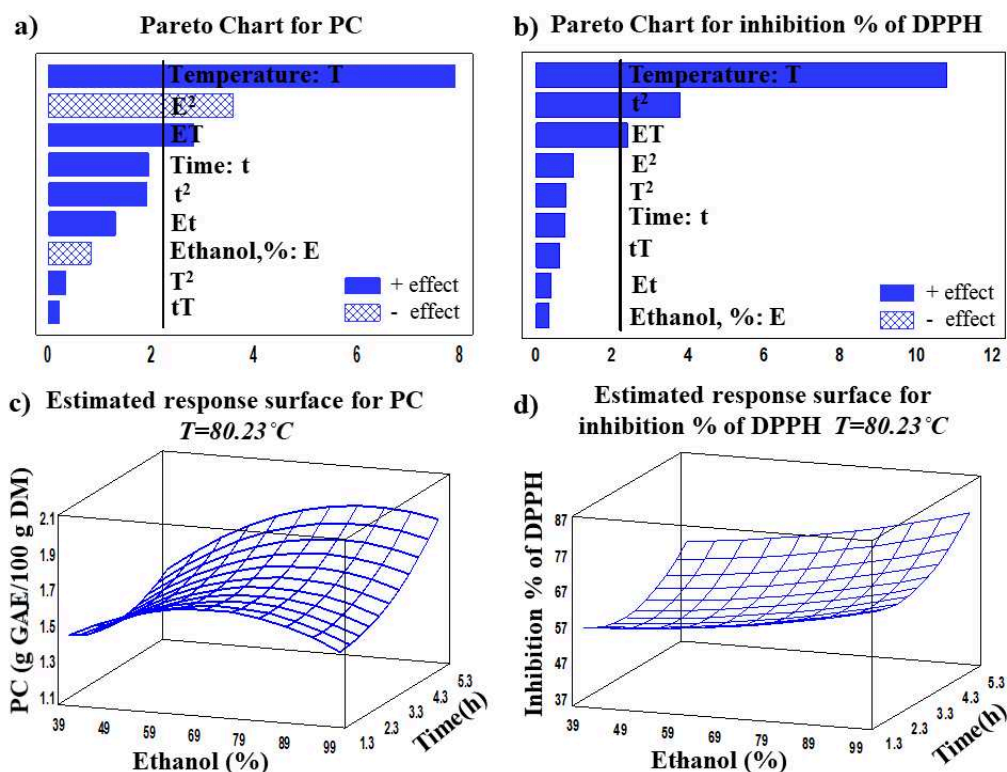


Figure 2. Standardized Pareto Charts for PC (a) and for the inhibition % of DPPH (b). Estimated response surface for PC (c) and for the inhibition % of DPPH (d). The PC extracts were obtained after SL extraction

2.2. Infrared-assisted extraction

Figure 3a shows the Pareto chart for the PC obtained by IRAE. As in SL extraction, phenolic compounds solubility increased with temperature, thus facilitating phenolic compounds diffusion out of the cells. For the same temperature of 80 °C, the extraction of phenolic compounds

increased by 1.2 times with IRAE (35% ethanol for 1 h), comparing with the conventional SL extraction (65% ethanol for 3 h). This could be associated with cell bursting created during IR heating. Ethanol has also positive linear effect on phenolic compounds extraction. It acts on the polarity of the solvent, which permits to solubilize lipophilic phenolic compounds. IR waves are efficiently absorbed by the solvent, which leads to efficient heating and favorize the cells rupture for a better extraction of phenolic compounds (Cai, Yu, Duan, & Li, 2011; Qu et al., 2016). The extraction of PC with IR is negatively affected by the quadratic effect of time (t^2). Higher temperatures improve the solubility of phenolic compounds by reducing the viscosity of the medium, but high temperatures and long periods of time risk heat degradation and oxidation of phenolic compounds (Rajha et al. 2015).

Figure 3b shows that temperature, time, and ethanol have linear positive effects on the inhibition percentage of DPPH. The inhibition percentage increased from 34% to 56% when the ethanol percentage, the treatment duration and the temperature increased respectively from 15%, 0.5 h and 40 °C to 55%, 1.5h and 70 °C. However, quadratic effects of ethanol (E^2) and temperature (T^2) have negative effects on the inhibition % of DPPH. At high temperatures, the stability of PC may be negatively affected. Also a possible thermal degradation of PC already released at low temperatures may occur (Rajha et al. 2013).

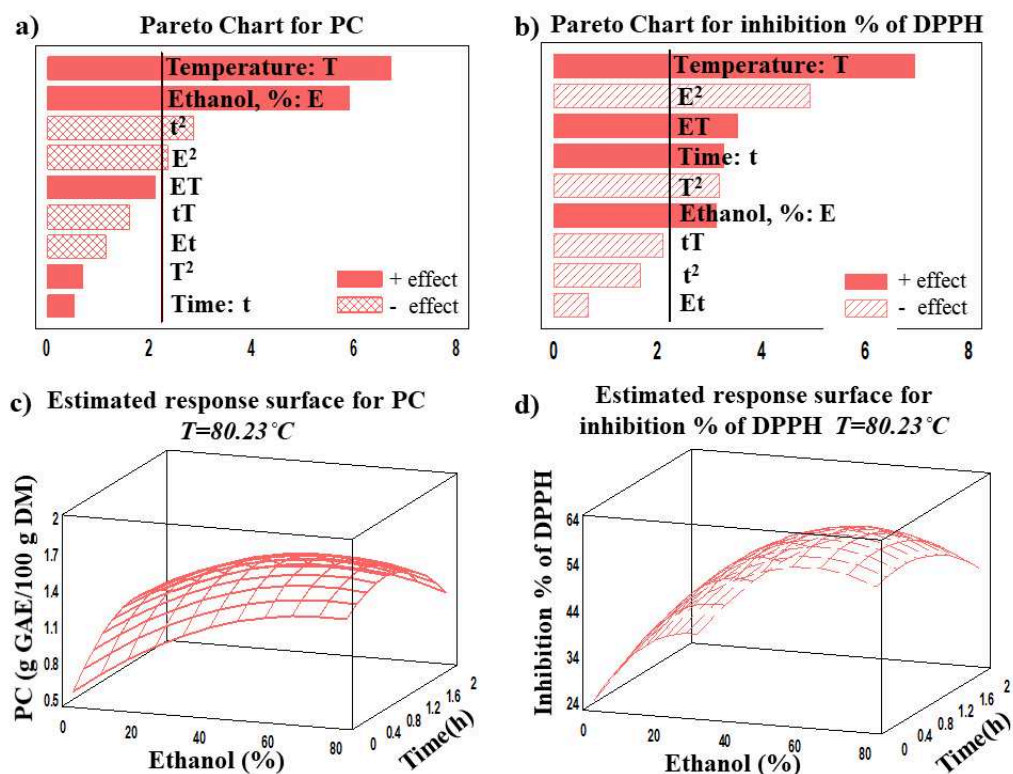


Figure 3. Standardized Pareto Charts for PC (a) and for the inhibition % of DPPH (b). Estimated response surface for PC (c) and for the inhibition % of DPPH (d). The PC extracts were obtained after IRAE.

2.3. Multiple response optimization: comparison between solid-liquid extraction and infrared assisted extraction

The optimization of the phenolic compounds and the inhibition % of DPPH were effected separately and the parameters giving the highest quantity of PC, and the highest inhibition of the free radical DPPH were determined. It is important to compromise between the concentrations of the phenolic compounds and their bioactivity. This is why it is necessary to show simultaneously the two responses (PC and inhibition % of DPPH) affected by the combination of the experimental parameters (E, t, T). The simultaneous optimums obtained with the conventional SL extraction, for both PC and inhibition % were respectively 1.67 g/100g DM and 59.4%. These optimums were found with 79% of ethanol, for 4 h at 73 °C. However, with IRAE a higher yield of PC (1.97g/100 g DM) with an inhibition of 58.5% was obtained with 51% of ethanol at 79 °C and for a treatment duration 4 times lower than that of the solvent extraction. The exactitude of the model was verified by repeating the optimal conditions for the optimization of PC and inhibition percentage for both solvent extraction and IRAE (Table 3). IRAE allows the

extraction of an upper amount of PC with lower time and solvent consumption. This result was already shown on the extraction of PC from grape seeds (Cai et al., 2011). In IRAE, the solvent mixture is heated directly, while in conventional SL extraction, a certain period is required to heat the container before the heat is transferred to the solution (Chen et al. 2010). The efficiency of IRAE can be due to the IR radiation that could stimulate the vibrations in molecules in diverse modes like extending, bending, rocking and rotating (Wang et al., 2008). These vibrations increased the interactions between the solvent extraction and the active compounds (Chen, Liu, and Chen 2011), allowing an efficient extraction of phenolic compounds from orange peels.

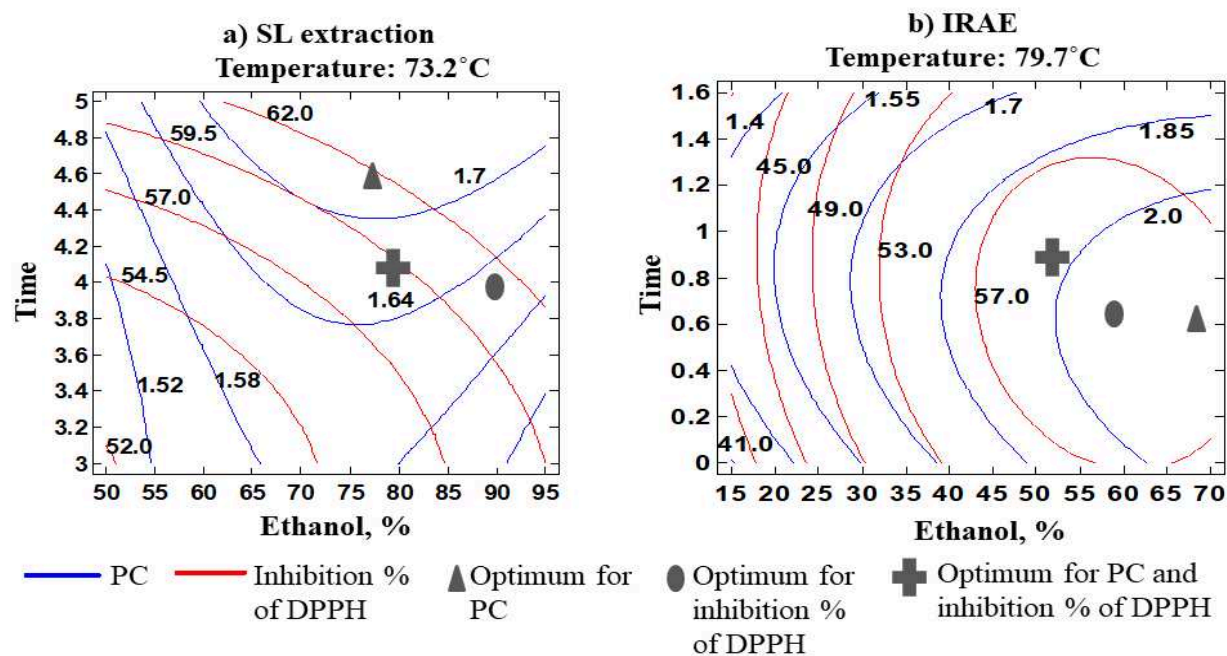


Figure 4. Superpositions plots for PC and inhibition percentage of DPPH for SL extraction (a) and IRAE (b) obtained at the optimal temperatures for the two responses simultaneously. Note that for SL extraction, the optimal temperatures for PC and inhibition % of DPPH are different from the optimal temperature of the two responses simultaneously.

Table 3. Predicted and experimental results for PC and inhibition %, at the multiple optimum conditions for SL extraction and IRAE.

	Multiple optimum	predicted	experimental
SL extraction	PC	1.67	1.65
	Inhibition, %	59.36	58.68
IRAE	PC	1.97	1.94
	Inhibition, %	58.51	59.34

2.4. Concentrations and diversity of phenolic compounds extracted from blood orange peels

HPLC analyses were done on the simultaneous optimums obtained after SL extraction and IRAE. Table 4 shows the concentration and diversity of the PC at the optimal points. In terms of diversity, the same compounds were found in SL extracts and IR extracts (gallic acid, resveratrol, quercetin, hesperidin, naringin and eriocitrin) except that caffeic acid that was found only in SL extracts and catechin only in IR extracts. Flavonoids and specially hesperidin were the major phenolic compound in orange peels. The quantity of gallic acid, resveratrol, quercetin, and hesperidin obtained after IRAE were higher than those obtained after SL extraction. While the quantity of naringin and eriocitrin were higher in SL extracts. Phenolic diversity and quantity depend on the method of extraction and higher phenolic compounds yields were obtained with IRAE.

Table 4. PC (mg/100 g DM) obtained in the simultaneous optimums after SL extraction and IRAE

PC (mg/100 g DM)	SL	IRAE
Gallic acid	2.33	2.44
Resveratrol	28.46	34.89
Quercetin	5.50	6.47

Catechin	0.18	nd
Cafeic acid	nd	0.16
Hesperidin	286.67	355.60
Naringin	66.76	32.31
Eriocitrin	32.31	10.66

2.5. Antifungal activity

The activities of the simultaneous optimums obtained after SL extraction and IRAE against the growth of *A. flavus* and the production of AFB1 were studied. Figure 5a shows that phenolic compounds extracts obtained from SL extraction and IRAE slightly inhibited the growth of *A. flavus* by 11.8% and 15.8% respectively. However, the inhibition of Aflatoxin production was greater than the inhibition of the growth of the fungus. Both PC extracts obtained from SL extraction and IRAE inhibited AFB1 production by 99.4% and 98.9% respectively (Figure 5b).

AFB1 is synthesized by enzymes encoded within a large cluster of 27 genes. Mycotoxin production is governed by complex environmental signals and different cellular pathways (Caceres et al., 2016). PC may inhibit the production of AFB1 by acting at one of the three levels: altering the environmental and physiological signals perceived by the fungi, down regulating the genes expression of the cluster or blocking the activity of certain enzymes involved in the biosynthesis of AFB1 (Holmes, Boston, & Payne, 2008).

Extracts from plants or spices, including phenolic compounds and essential oils have demonstrated fungicidal and/or anti-toxinogenic properties. In some cases, extracts inhibit the fungal growth and the production of mycotoxin. In other cases, the growth of the fungi is not affected but the production of mycotoxin is partially or totally inhibited. A variety of flavonoids in tea leaves inhibited the production of AFB1 without affecting the mycelial growth of *A. flavus*. They decreased the production of AFB1 by 99.6%. The inhibition of aflatoxin was attributed to the down-regulations of transcription of genes involved in aflatoxin biosynthesis (Mo, Zhang, Wu, & Hu, 2013). Extracts of the plant *Garcinia indica* inhibited the growth of *A. flavus* and the subsequent production of AFB1 (Selvi et al., 2003). Eugenol (0.5 mM), the active compound of many essential oils, slightly affected the fungal growth but totally inhibited the production of AFB1. It has been demonstrated that all cluster genes were strongly down

regulated in the presence of eugenol. 19 of 27 genes were completely inhibited and the others had 10- to 20-fold reductions in their expression levels (Caceres et al., 2016). In our case, PC from blood orange peels are specific inhibitors of AFB1 biosynthesis rather than inhibitors of the fungi growth. This is interesting, since the presence of *A. flavus* that can't produce AFB1 will avoid the contamination of foods with other microbial agents producers of other toxins, and won't imbalance the fungal ecology in the field. PC extracts from blood orange peels could be developed as anti-aflatoxin agents in food preservation.

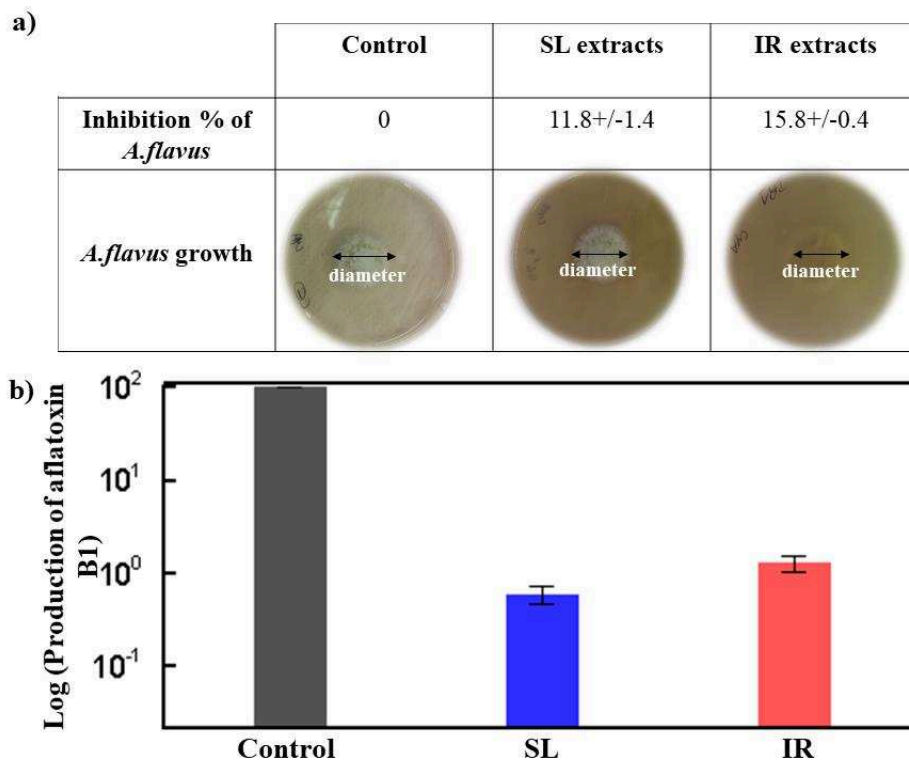


Figure 5. Inhibition growth of *A.flavus* by simultaneous optimums extracts obtained after SL extraction and IRAE (a). Effect of the simultaneous optimums extracts obtained after SL extraction and IRAE on the production of Aflatoxin B1 (b).

3. Conclusions

Our study aimed at valorizing orange peels using a simple and low-cost extraction method that has the potential to improve the extraction of phenolic compounds from orange peels: infrared-assisted extraction. The bioactivity of the extracted phenolic compounds was tested on the inhibition of the growth of *A. flavus* and the production of Aflatoxin B1 by the same fungus. We used a central composite design to optimize the infrared-assisted extraction of phenolic compounds. Based on the response surface methodology, the optimal phenolic compounds

extraction parameters are as follows: extraction temperature: 79 °C, extraction time: 0.88 h and ethanol percentage: 51%. Under these optimized conditions, the experimental yield of phenolic compounds and their inhibition percentage, agreed closely with the predicted yield and were higher than those obtained with the conventional solid-liquid extraction. Extracted phenolic compounds are alternative natural inhibitors of the production of the carcinogenic Aflatoxin B1 produced by *A. flavus*. Phenolic compounds can represent an alternative strategy to the use of pesticides to control crop contamination. They can be commercially exploited and applied to food systems. It will be interesting to study the molecular mechanism responsible for the inhibition of Aflatoxin B1 by phenolic compounds extracted from blood orange peels.

References

- Anagnostopoulou, M. A., Kefalas, P., Papageorgiou, V. P., Assimopoulou, A. N., & Boskou, D. (2006). Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food Chemistry*, 94(1), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.047>
- Bluma, R., Amaiden, M. R., Daghero, J., & Etcheverry, M. (2008). Control of *Aspergillus section Flavi* growth and aflatoxin accumulation by plant essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 105(1), 203–214. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03741.x>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Caceres, I., El Khoury, R., Medina, Á., Lippi, Y., Naylies, C., Atoui, A., ... Puel, O. (2016). Deciphering the anti-aflatoxinogenic properties of eugenol using a large-scale q-PCR approach. *Toxins*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/toxins8050123>
- Cai, Y., Yu, Y., Duan, G., & Li, Y. (2011). Study on infrared-assisted extraction coupled with high performance liquid chromatography (HPLC) for determination of catechin, epicatechin, and procyanidin B2 in grape seeds. *Food Chemistry*, 127(4), 1872–1877. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.026>
- Chen, Q., Liu, T., & Chen, G. (2011). Highly Efficient Proteolysis Accelerated by Electromagnetic Waves for Peptide Mapping. *Current Genomics*, 12(6), 380–390. <https://doi.org/10.2174/138920211797248583>

- Chen, Y., Duan, G., Xie, M., Chen, B., & Li, Y. (2010). Infrared-assisted extraction coupled with high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of eight active compounds in *Radix Salviae miltiorrhizae*. *Journal of Separation Science*, 33(17–18), 2888–2897. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000234>
- Chen, Z. T., Chu, H. L., Chyau, C. C., Chu, C. C., & Duh, P. Der. (2012). Protective effects of sweet orange (*Citrus sinensis*) peel and their bioactive compounds on oxidative stress. *Food Chemistry*, 135(4), 2119–2127. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.041>
- D'Alessandro, G. L., Kriaa, K., Nikov, I., & Dimitrov, K. (2012). Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and Purification Technology*, 93, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.03.024>
- De Moraes Barros, H. R., De Castro Ferreira, T. A. P., & Genovese, M. I. (2012). Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. *Food Chemistry*, 134(4), 1892–1898. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.090>
- EL Khoury, A., Rizk, T., Lteif, R., Azouri, H., Delia, M. L., & Lebrihi, A. (2008). Fungal contamination and Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Lebanese wine-grapes and musts. *Food and Chemical Toxicology*, 46(6), 2244–2250. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.02.026>
- Farhat, A., Fabiano-Tixier, A. S., Maataoui, M. El, Maingonnat, J. F., Romdhane, M., & Chemat, F. (2011). Microwave steam diffusion for extraction of essential oil from orange peel: Kinetic data, extract's global yield and mechanism. *Food Chemistry*, 125(1), 255–261. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.110>
- Garcia-Castello, E. M., Rodriguez-Lopez, A. D., Mayor, L., Ballesteros, R., Conidi, C., & Cassano, A. (2015). Optimization of conventional and ultrasound assisted extraction of flavonoids from grapefruit (*Citrus paradisi* L.) solid wastes. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1114–1122. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.024>
- González-Gómez, D., Cardoso, V., Bohoyo, D., Ayuso, M. C., & Delgado-Adamez, J. (2014). Application of experimental design and response surface methodology to optimize the procedure to obtain a bactericide and highly antioxidant aqueous extract from orange peels. *Food Control*, 35(1), 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.013>
- Guimarães, R., Barros, L., Barreira, J. C. M., Sousa, M. J., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and

- orange. *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.09.022>
- Hegazy, A. E., & Ibrahim, M. I. (2012). Antioxidant activities of orange peel extracts. *World Applied Sciences Journal*, 18(5), 684–688. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2012.18.05.64179>
- Holmes, R. A., Boston, R. S., & Payne, G. A. (2008). Diverse inhibitors of aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(4), 559–572. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1362-0>
- Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Dangles, O., & Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 119(2), 851–858. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.046>
- Kohiyama, C. Y., Yamamoto Ribeiro, M. M., Mossini, S. A. G., Bando, E., Bomfim, N. D. S., Nerilo, S. B., ... Machinski, M. (2015). Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chemistry*, 173, 1006–1010. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.135>
- Kumar, S., Sharma, U. K., Sharma, A. K., & Pandey, A. K. (2012). Protective efficacy of *Solanum xanthocarpum* root extracts against free radical damage: Phytochemical analysis and antioxidant effect. *Cellular and Molecular Biology*, 58(1), 174–181. <https://doi.org/10.1170/T938>
- Lagha-Benamrouche, S., & Madani, K. (2013). Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*, 50, 723–730. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.048>
- Li, B. B., Smith, B., & Hossain, M. M. (2006). Extraction of phenolics from citrus peels II. Enzyme-assisted extraction method B.B. Separation and Purification Technology, 48, 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2005.07.019>
- Librán, M. C., Mayor, L., Garcia-Castello, M. E., & Vidal-Brotons, D. (2013). Polyphenol extraction from grape wastes: Solvent and pH effect. *Agricultural Sciences*, 4(9), 56–62. <https://doi.org/10.4236/as.2013.49B010>
- Londoño-Londoño, J., Lima, V. R. de, Lara, O., Gil, A., Pasa, T. B. C., Arango, G. J., & Pineda, J. R. R. (2010). Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method. *Food Chemistry*, 119(1), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.075>
- Lou, S. N., Lai, Y. C., Hsu, Y. S., & Ho, C. T. (2016). Phenolic content, antioxidant activity and effective

- compounds of kumquat extracted by different solvents. *Food Chemistry*, 197, 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.096>
- Luengo, E., Álvarez, I., & Raso, J. (2013). Improving the pressing extraction of polyphenols of orange peel by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 17, 79–84.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.10.005>
- Mo, H. Z., Zhang, H., Wu, Q. H., & Hu, L. B. (2013). Inhibitory effects of tea extract on aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Letters in Applied Microbiology*, 56(6), 462–466.
<https://doi.org/10.1111/lam.12073>
- Nayak, B., Dahmoune, F., Moussi, K., Remini, H., Dairi, S., Aoun, O., & Khodir, M. (2015). Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from *Citrus sinensis* peels. *Food Chemistry*, 187, 507–516.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.081>
- Nipornram, S., Tochampa, W., Rattanatraiwong, P., & Singanusong, R. (2018). Optimization of low power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampung) peel. *Food Chemistry*, 241(August 2017), 338–345.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.114>
- Nurk, E., Refsum, H., Drevon, A. C., Tell, S. ., Harald, A. ., Engedal, K., & Smith, A. . (2009). Intake of Flavonoid-Rich Wine , Tea , and Chocolate by Elderly Men and ... *J Nutr*, 139(1), 120–127.
<https://doi.org/10.3945/jn.108.095182.oxidant>
- Pandey, K., & Rizvi, S. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270–278.
- Parniakov, O., Barba, F. J., Grimi, N., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2016). Extraction assisted by pulsed electric energy as a potential tool for green and sustainable recovery of nutritionally valuable compounds from mango peels. *Food Chemistry*, 192, 842–848.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.096>
- Qu, Y., Li, C., Zhang, C., Zeng, R., & Fu, C. (2016). Optimization of infrared-assisted extraction of *Bletilla striata* polysaccharides based on response surface methodology and their antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*, 148, 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.081>
- Rafiq, S., Kaul, R., Sofi, S. A., Bashir, N., Nazir, F., & Ahmad Nayik, G. (2016). Citrus peel as a source

- of functional ingredient: A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*.
<https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.07.006>
- Rajha, H. N., Chacar, S., Afif, C., Vorobiev, E., Louka, N., & Maroun, R. G. (2015). β -Cyclodextrin-Assisted Extraction of Polyphenols from Vine Shoot Cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(13), 3387–3393. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00672>
- Rajha, N. H., EL Darra, N., Vorobiev, E., Louka, N., & Maroun, R. G. (2013). An Environment Friendly, Low-Cost Extraction Process of Phenolic Compounds from Grape Byproducts. Optimization by Multi-Response Surface Methodology. *Food and Nutrition Sciences*, 4(6), 650–659. <https://doi.org/10.4236/fns.2013.46084>
- Rizvi, S. ., & Abu Zaid, M. (2001). Insulin-like effect of (-)epicatechin on erythrocyte membrane acetylcholinesterase activity in type 2 diabetes mellitus. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 28(9), 776–778. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2001.03513.x>
- Selvi, A. T., Joseph, G. S., & Jayaprakasha, G. K. (2003). Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus flavus* by *Garcinia indica* extract and its antioxidant activity. *Food Microbiology*, 20(4), 455–460. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00142-9](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00142-9)
- Verheecke, C. (2014). MODULATION OF AFLATOXIN B1 PRODUCTION BY ASPERGILLUS FLAVUS. MODULATION OF AFLATOXIN B1 PRODUCTION BY ASPERGILLUS FLAVUS, 1–189. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.04.007>
- Wang, S., Zhang, L., Yang, P., & Chen, G. (2008). Infrared-assisted tryptic proteolysis for peptide mapping. *Proteomics*, 8(13), 2579–2582. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800086>
- Zia-ur-Rehman. (2006). Citrus peel extract - A natural source of antioxidant. *Food Chemistry*, 99(3), 450–454. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.054>

3.2.2. Intensification de l'extraction des polyphénols à partir des peaux d'oranges avec les ultrasons : prétraitement des peaux avec les infrarouges

L'article «Intensification of ultrasound assisted extraction of polyphenols from orange peels by an energy saving pre-treatment » a été soumis dans le journal «The Journal of Food Biochemistry » en 2018. Cette étude porte sur le prétraitement des peaux d'oranges avec les infrarouges sans solvant, avant l'extraction des polyphénols avec les ultrasons dans le mélange hydroéthanolique.

3.2.2.1. Résumé de l'article

Dans la première étude effectuée avec les infrarouges, nous avons vu les avantages de cette méthode d'extraction. En comparant avec l'extraction SL, les IR ont permis de réduire la consommation en éthanol ainsi que la durée du traitement, en donnant des rendements supérieurs en polyphénols. Les polyphénols extraits avec les IR n'ont pas été dégradés et ont montré une activité biologique importante. Dans cette deuxième étude, l'effet des infrarouges a été évalué pour le prétraitement des peaux d'agrumes, sans l'ajout d'aucun solvant. Une autre technologie d'extraction « les ultrasons » a été testée et comparée avec l'extraction SL conventionnelle.

Sans prétraitement avec les IR, les US ont permis d'extraire 1,6 fois plus de polyphénols par rapport à l'extraction SL conventionnelle dans 50% éthanol-eau. D'où l'effet positif du processus de cavitation induit par les US, sur l'accélération de la diffusion à travers les membranes cellulaires. Après la détermination de la durée optimale de prétraitement avec les IR (20 min), l'extraction SL ou l'extraction avec les US a été faite sur les peaux prétraitées, dans 50% éthanol-eau. Le prétraitement avec les IR a permis d'augmenter les rendements en polyphénols de 0,8 à 1,18 g/100 g MS pour l'extraction SL et de 1,30 à 1,7 g/100 g MS pour l'extraction avec les US. Ce résultat montre l'effet positif de l'étape de prétraitement avec les IR sans solvant, sur la fragilisation des structures cellulaires et par suite l'augmentation de la diffusion des polyphénols dans l'étape d'extraction qui suit.

Après avoir observé l'avantage de combiner le prétraitement avec par IR avec les US, différentes combinaisons ont été réalisées, en faisant varier les durées des IR et des US, afin de trouver un compromis entre les rendements en polyphénols obtenus et les consommations énergétiques. La même concentration en polyphénols (1,24 g/100 g MS) a été obtenue après 20 min de prétraitement avec les IR suivi de 5 min d'US et après 5 min de prétraitement avec les IR suivi de 30 min d'US, avec une consommation d'énergie de 125 kJ/kg et 290 kJ/kg respectivement. De plus, la

concentration en polyphénols (1,53 g/100 g MS) obtenue après 20 min de prétraitement avec les IR suivi de 20 min d'US était supérieure de 10% à celle obtenue après 15 min de prétraitement IR suivi de 30 min d'US (1,38 g/100 g MS). Dans ce cas, la durée du traitement et la consommation d'énergie ont été respectivement inférieures de 12% et de 27%.

La consommation en énergie permettant d'obtenir 1g de polyphénols, a été calculée en fonction des différentes combinaisons. La combinaison la plus efficace en termes de consommation d'énergie (120 kJ/kg/g de polyphénols) est de prétraiter les peaux pendant 20 min avec les IR, sans solvant suivi d'un traitement de 5 min avec les ultrasons dans 50% éthanol-eau.

3.2.2.2. Article: Intensification of ultrasound assisted extraction of polyphenols from orange peels by an energy saving pretreatment

(Voir le manuscrit qui suit)

Intensification of ultrasound assisted extraction of polyphenols from orange peels by an energy saving pre-treatment

Abstract

In this study, the impact of “infrareds free solvent” pre-treatment was studied for the intensification of polyphenols extraction from orange peels. The application of ultrasounds on fresh orange peels enhanced the extraction of polyphenols (1.30 g/100 g DM) compared to solid-liquid extraction (0.8 g/100 g DM). To intensify the extraction of polyphenols, orange peels were pre-treated with infrared heating from 5 min to 25 min at 50°C. Ultrasounds or solid-liquid extraction were then applied, from 5 min to 30 min, on pre-treated orange peels. 20 min of infrared pre-treatment improved the extraction of polyphenols by 1.48 times with solid-liquid extraction, and 1.3 times with ultrasounds after 30 min of extraction. Different combinations of infrared pretreatment and ultrasound assisted extraction were then applied on orange peels. The most advantageous combination in terms of energy consumption and polyphenols extraction, has been found for a 20 min infrared pre-treatment time and 30 min ultrasound assisted extraction of polyphenols.

Keywords: Infrareds, Pre-treatment; Ultrasounds; Polyphenols; Orange peels

1. Introduction

Orange fruit is highly consumed around the world, for containing many nutrients like vitamins, dietary fibers, minerals and many phytochemicals including polyphenols, amino acids and carotenoids. It is consumed in the natural and peeled forms and as juice (Rezzadori, Benedetti, & Amante, 2012). The industrial processing of orange fruit results in large amounts of by-products (peels, pulps, seeds). These by-products, if untreated, can become a possible source of environmental pollution (De Moraes Barros, De Castro Ferreira, & GenoveSE, 2012). Orange peels, the main orange by-product, are a rich source of bioactive compounds such as polyphenols and pectin (Hegazy & Ibrahim, 2012). The extraction of polyphenols from orange peels was conducted by different conventional and alternative methods (solvent extraction, enzymes assisted extraction, pulsed electric field, ultrasounds and microwaves) (Hegazy & Ibrahim, 2012; Khan, Abert-Vian, Fabiano-Tixier, Dangles, & Chemat, 2010; Lagha-Benamrouche & Madani, 2013; Li et al., 2006; Londoño-Londoño et al., 2010; M'hiri, Ioannou, Mihoubi Boudhrioua, & Ghoul, 2015).

Ultrasounds (US) have been effective for the extraction of bioactive and high-added value molecules from different biological matrices (Koubaa et al., 2016). US are mechanic waves with frequencies above human hearing but below microwave frequencies (from 20 KHz to 10 MHz). Ultrasound waves propagate through the solid-liquid medium inducing cycles of expansion (low pressure) and compression (high pressure). During the expansion cycle, cavitation bubbles grow. During the compression cycle, cavitation bubbles decrease in size and collapse, stimulating thus local pressure and temperature raises, up to 50 MPa and 5000°C, respectively (Chemat et al., 2017). Bubbles cavitation breaks plant material particles and cells, facilitates the release of extractable compounds and increases the mass transport inside of plant tissue (Chemat, Zill-E-Huma, & Khan, 2011). US have been successively used for the extraction of pectin from grapefruit (Bagherian, Zokaee Ashtiani, Fouladitajar, & Mohtashamy, 2011), essential oil and lipids from oilseed (Khoei & Chekin, 2016; H. Li, Pordesimo, & Weiss, 2004; Zhang et al., 2008) and polyphenols from spinach (Altemimi, Choudhary, Watson, & Lightfoot, 2015), grapes (Carrera, Ruiz-Rodríguez, Palma, & Barroso, 2012), strawberries (Herrera & Luque De Castro, 2005), coffee grounds (Al-Dhabi, Ponmurugan, & Maran Jeganathan, 2017) and orange peels (Khan et al., 2010; Londoño-Londoño et al., 2010; M'hiri et al., 2015). US permits better penetration of the solvent into the cellular material, the lower solvent consumption and the shorter extraction time (Chemat et al., 2017).

The pretreatment of the plant material with infrared (IR) radiations is a simple and low-cost method and has many advantages. IR waves (wavelengths between about 750 nm and 1 mm) are highly absorbed by the material (Qu, Li, Zhang, Zeng, & Fu, 2016) and improve molecular vibrations i.e. stretching, bending, rocking and twisting (Wang, Zhang, Yang, & Chen, 2008).

To the best of our knowledge, there is no information in the literature on the application of IR as a pretreatment of orange peels prior to the polyphenols extraction process. The IR system was developed and patented at Saint-Joseph university of Beirut (reference du projet). The objective of this work was to evaluate the effect of IR pretreatment on the intensification of polyphenols extraction by the conventional solid-liquid extraction (SL) and US assisted extraction.

2. Materials and methods

2.1. Orange peels

Orange peels were provided from a juice production industry “Balkis” (Lebanon) and stocked at -20°C until use. The moisture content, measured by drying 25 g of fresh peels at 105°C to constant weight, was about 73 wt %.

2.2 Experimental methods

The general scheme of experiments is shown in Fig. 1. The peels were initially pre-treated by IR solvent free. The US extraction of polyphenols from pre-treated orange peels was then conducted in ethanol-water.

2.2.1 IR pre-treatment

Fresh orange peels were put in a round bottom flask without solvent addition. The flask was fixed in a ceramic infrared transmitter for the heating process linked to a PID control and temperature adjustment system. The delivered power by the system was 60 W. The temperature was fixed at 50°C. The increase in temperature in orange peels during IR pretreatment was recorded inside the geometrical centre of the peels, using a teflon-coated thermocouple, Thermocoax type 2 (AB 25 NN). The treatment time was varied between 5 min and 25 min. Beyond this treatment time, orange peels were burned. To determine the optimal IR pretreatment duration, a SL extraction of polyphenols was conducted on pretreated orange peels, in water (liquid-to-solid ratio, w/w was 8) at 50°C for 1.5 h. The specific energy per minute (Fig 2a) can be evaluated as $\Delta W = C\Delta T \approx 3.98 \text{ kJ/kg}$, where $C \approx 3.61 \text{ kJ/kg } ^\circ\text{C}$ is the specific heat capacity of orange fruit (Ikegwu, Ekwu, & others, 2009). To determine the

maximal mass of orange peels that can be pretreated, the mass of orange peels was varied between 20 g and 300 g at the optimal IR treatment time. Then a SL extraction of polyphenols was conducted on pretreated orange peels, in water (liquid-to-solid ratio, w/w was 8) at 50°C for 1.5 h.

2.2.2. Extraction experiments

2.2.2.1. Solid-liquid extraction

The effect of ethanol concentration (0%, 25%, 50%, 75% and 100% ethanol and water) on polyphenols extraction was tested. 5 g of fresh orange peels and 40 mL of ethanol-water were introduced in a 200-mL capacity flask. The extraction was conducted at 50°C with stirring at 160 rpm for 1.5 h. Increasing ethanol concentration from 25% to 50% decreased the dielectric constant of the medium and significantly increased the polyphenols extraction. However, no significant difference was observed for the percentages of 50% and 75% (Figure 3). Based on these results, for the following experiments, the SL extraction was conducted with 50% ethanol/water (v/v) at 50°C (liquid-to-solid ratio, w/w was 8), and stirred at 160 rpm from fresh and pretreated orange peels. The time of diffusion was varied between 5 and 30 min.

2.2.2.2. Ultrasounds

The extraction was carried out using an US generator UP 400S (Hielscher GmbH, Germany) connected to a titanium ultrasound probe. The US generator operated at the maximal power of 400 W and frequency f of 24 kHz. The ultrasound probe (H14 Hielscher GmbH, Germany) has a diameter of 14 mm and a total length of 100 mm. The probe length was immersed in the narrow-necked glass flask of 1000 mL containing fresh or IR pretreated orange peels and 50% ethanol/water (v/v) at 50°C (liquid-to-solid ratio, w/w was 8). To avoid heating induced by US, the flask was immersed into a cooling bath, composed by an ice/water mixture. The amplitude was fixed at 100% which corresponds to the nominal power of 400 W. The specific energy per minute (Fig 2b) can be evaluated as $\Delta W = C\Delta T \approx 8.96$ kJ/kg, where $C \approx 3.32$ kJ/kg °C is a specific heat capacity of the solvent (50% ethanol/water (v/v)). The duration of ultrasounds was varied from 5 to 30 min.

2.2.2.3. IR pretreatment followed by ultrasound assisted extraction

To maximize the extraction of polyphenols from orange peels, ultrasounds have been applied on IR pretreated orange peels. To choose the best combination of IR pretreatment and US, a series of experiments was conducted. First, the optimal infrared duration was fixed and the duration of the ultrasound was varied from 5 to 30 min. Second, the optimal duration of ultrasound was fixed and the duration of IR pretreatment was varied from 5 to 20 min. The

total energy consumption of IR pretreatment and US was calculated. The effectiveness of the different combinations in terms of energy consumption and polyphenols extraction has been determined.

2.3 Analysis

2.3.1 Total polyphenol content

The total polyphenol content extracted was determined in ethanol extracts from orange peels, using the Folin-Ciocalteu colorimetric method. 0.2 mL of the extract were mixed with 1 mL of ten-fold diluted Folin–Ciocalteu reagent (Merck, Darmstadt, Germany). Then 0.8 mL of sodium carbonate (Na_2CO_3) (75 g/L) (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France) was added. The mixture was incubated at 60°C for 10 min and then cooled at room temperature. The absorbance was measured at 750 nm by the UV-Vis spectrophotometer. Gallic acid (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) was used for the calibration curve. The results were expressed as mg of Gallic acid equivalent (GAE) per 100 gram of dry matter (mg / 100 g DM).

2.3.2. Antioxydant capacity

The inhibition percentage of extracted polyphenols was measured by the free radical, 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Brand-Williams, Cuvelier, & BerSET, 1995). This method is based on the reduction of the free radical DPPH by polyphenol extracts. 1.45 mL of DPPH (0.06 mM) radical was added to 50 μL of orange peels extracts or Trolox (control). After 30 min of incubation at room temperature, the absorbance was measured at 515 nm. The inhibition percentage of the DPPH free radical is calculated as follows:

$$\text{Inhibition Percentage} = \frac{(\text{absorbance of control} - \text{absorbance of sample})}{\text{absorbance of control}} \quad (1)$$

2.3.3. Effect of ultrasound treatment

The effect of ultrasounds was calculated using following equation:

$$\text{Effect of ultrasound (\%)} = \left[\frac{(A-B)}{B} \right] * 100 \quad (2)$$

Where A is the polyphenols concentration obtained with US extraction and B is the polyphenols concentration obtained with SL extraction from fresh or pretreated orange peels.

2.3.4. Effective diffusivity of polyphenols

Fick's second law was used to study the polyphenols diffusivity. Orange peels particles were considered as plane sheet. The solution of Fick's second law for a well-stirred solution of limited volume is (Crank 1979):

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2\alpha(\alpha+1)\exp(-Dq_n^2 t/l^2)}{1+\alpha+q_n^2 \alpha^2} \quad (3)$$

Where M_t is the polyphenol concentration in the extract after time t , M_{∞} is the maximal concentration of polyphenols after an infinite time, α , is the liquid/solid ratio (8), D is the coefficient of diffusion (m^2/s), l is the thickness of the particles, $n=5$, $q_1=1.5708$, $q_2=4.7124$, $q_3=7.854$, $q_4=10.9956$ and $q_5=14.1372$.

2.4 Statistical analysis

All experiments and measurements of characteristics were repeated using, at least, five replicates. The mean values and the standard deviations were calculated. The error bars in all the figures correspond to the confidence level 95%.

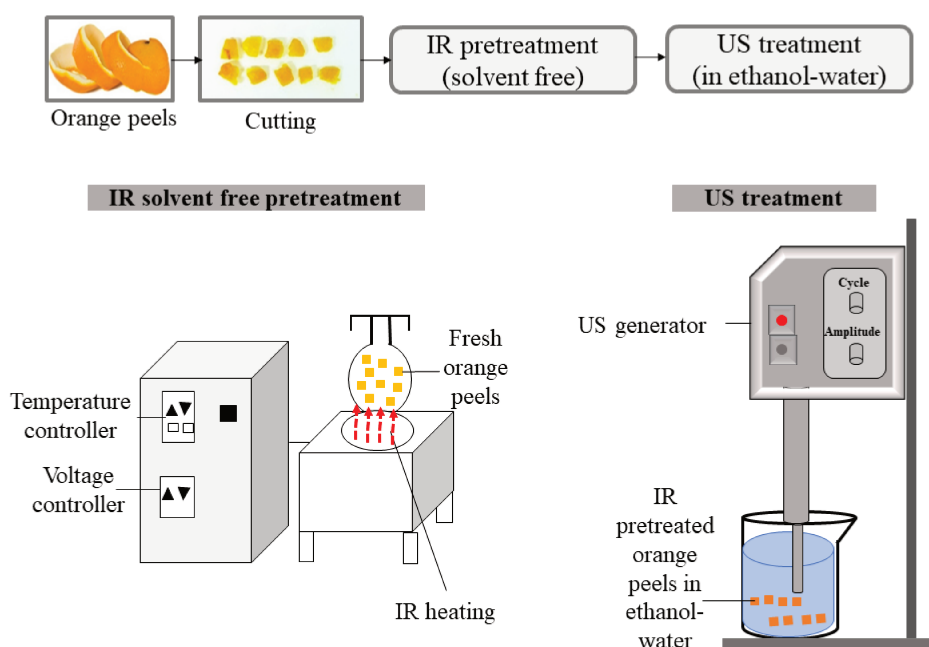


Figure 1. The general scheme of experiments.

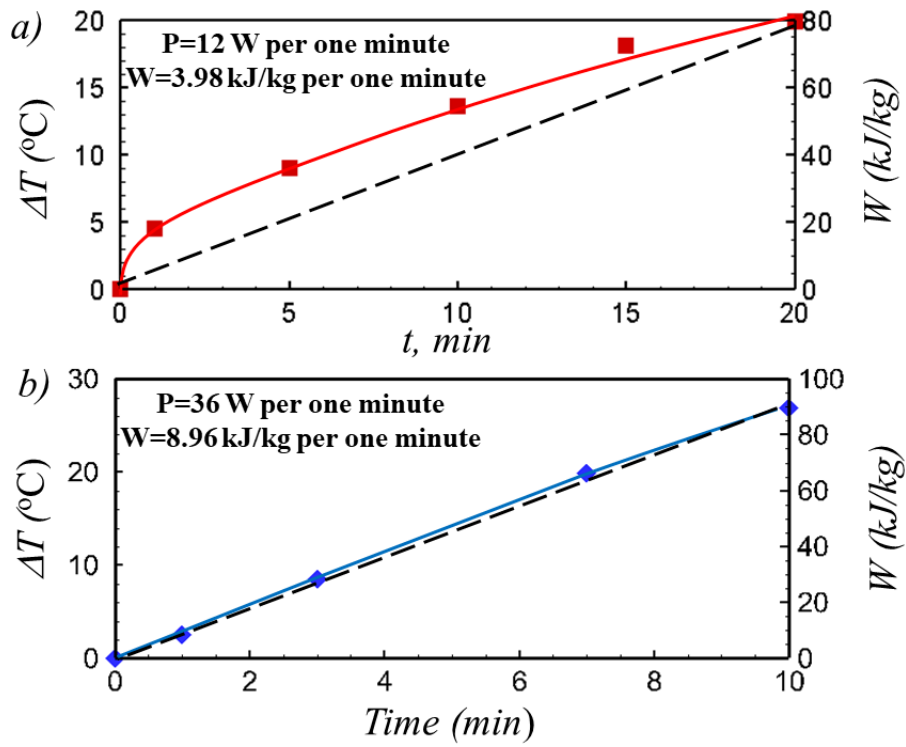


Figure 2. Temperature (ΔT) and specific energy (W) increase versus time of IR pretreatment (a) and US treatment (b).

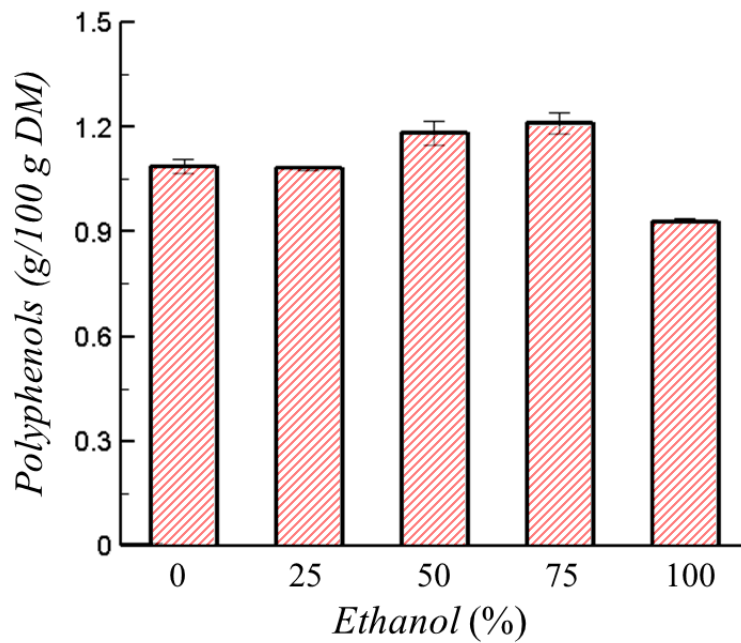


Figure 3. Concentration of polyphenols obtained after 1.5 h of solid-liquid extraction at 50 $^{\circ}\text{C}$, from fresh orange peels as a function of ethanol percentage.

3. Results and discussions

3.1. Effect of infrared pre-treatment on solid-liquid extraction

The variation of IR pretreatment time for orange peels from 5 min to 20 min increased the SL extraction of polyphenols (Figure 4). It may be explained by the degradation of the cell walls, that occurs during IR heating. However, for an irradiation time of 25 min, the extraction of polyphenols decreased. Thus, excessive irradiation time may degrade the orange peels contents and decrease the extraction efficiency. Similar results were observed for the infrared assisted extraction of polyphenols from grape seeds. The yields of polyphenols increased with the increase of irradiation time. However, when the irradiation time exceeds 30 min, the extraction yield of polyphenols slightly decreased (Cai, Yu, Duan, & Li, 2011).

Figure 5a presents the concentrations of polyphenols extracted during SL extraction from different mass of orange peels pre-treated with IR for 20 min. The same concentration of polyphenols was obtained after solid-liquid extraction from 20, 40 and 200 g of pre-treated orange peels. However, the concentration of polyphenols decreased from 1.42 to 1.08 g/100 g DM after the solid-liquid extraction, respectively from 200 g and 300 g of pre-treated orange peels. The pre-treatment of a high mass of peels doesn't have the same efficiency, since part of the mass will not be exposed to IR radiations. Thus, this part is partially treated or not treated at all. Figure 5b presents the required energy per gram of polyphenols as a function of different mass of pre-treated orange peels. The amount of energy consumed to obtain 1 gram of polyphenols is almost the same if we treat 20, 40 or 200g of orange peels. However, the treatment of 300 g of orange peels requires a higher amount of energy. Based on this result, we fixed the quantity of orange peels that will be pre-treated with IR, at 200 g.

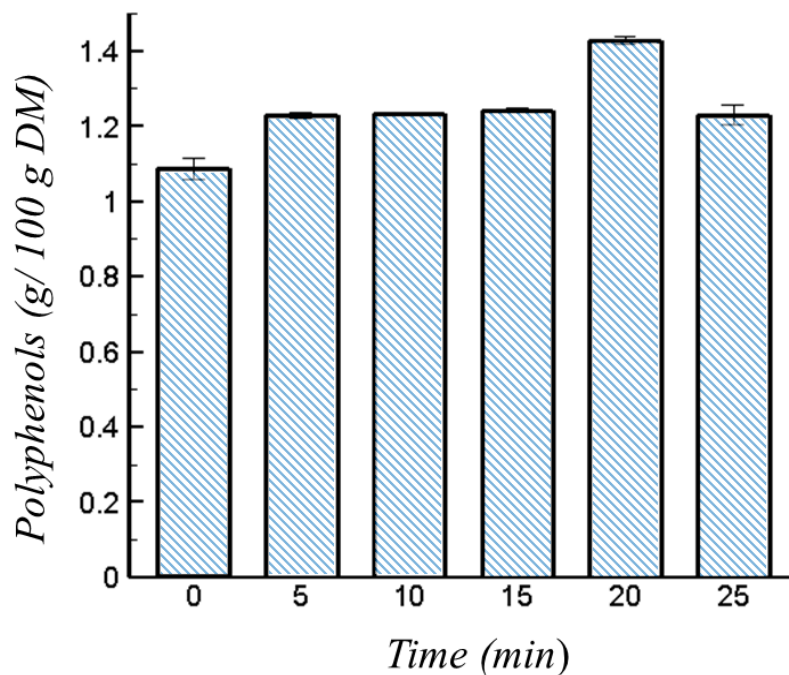


Figure 4. Concentration of polyphenols obtained after 1.5 h of solid-liquid extraction, in water at 50°C, as a function of infrared pretreatment time.

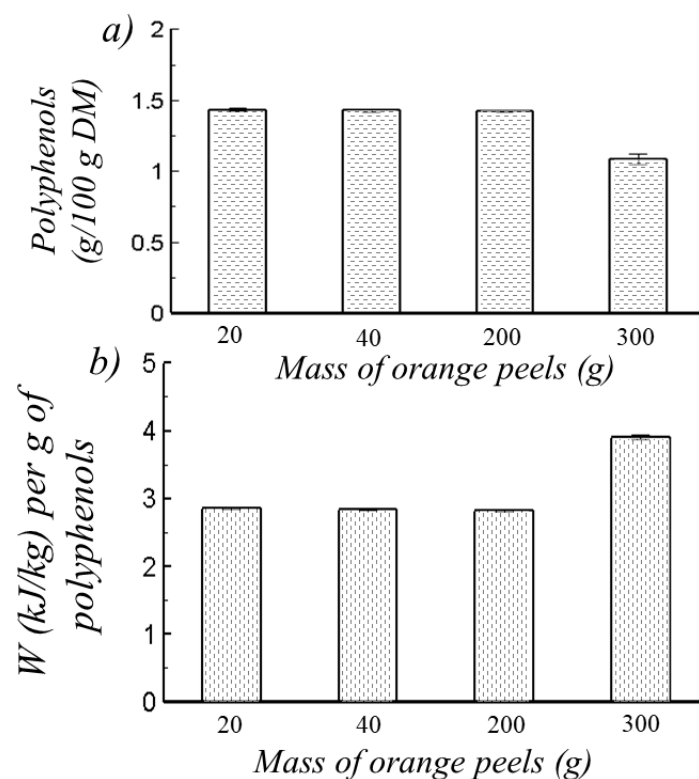


Figure 5. Concentration of polyphenols obtained after 1.5 h of solid-liquid extraction from IR pre-treated orange peels, in water at 50°C (a) and the required energy (kJ/kg) to extract one gram of polyphenols (b) as a function of different mass of IR pretreated orange peels.

Figure 6 compares the solid-liquid extraction of polyphenols, in 50% ethanol-water from untreated and IR pretreated orange peels. The results show the amplifier effect of IR pretreatment in increasing the extraction of polyphenols from orange peels even by the conventional SL extraction. IR radiation may allow the vaporization of water from orange peels, which increases the pressure in its microstructure and may allow the rupture of orange peels cells. Hence, the advantage of orange peels pretreatment for the intensification of the extraction of biomolecules. The pretreatment of orange peels with microwaves improved the subsequent extraction of pectin over 190%. Microwave pretreatment provoked an intensive vapor formation in the structure of orange peels, enhancing the pressure in it and modifying its physical properties (Kratchanova, Pavlova, & Panchev, 2004). Insert shows the diffusivities D (m^2/s) of polyphenols during SL extraction from untreated and IR pretreated orange peels. The extraction diffusivities reached from fresh and IR pretreated orange peels after 1.5 h of solid-liquid extraction were 1.14×10^{-11} and $2.03 \times 10^{-11} m^2/s$ respectively. IR pretreatment enhanced the polyphenol diffusivities during SL extraction. The vibration in molecules during IR pretreatment could activate bound phenolic compounds and enhance the release of polyphenols during the following extraction process (Lee et al, 2003).

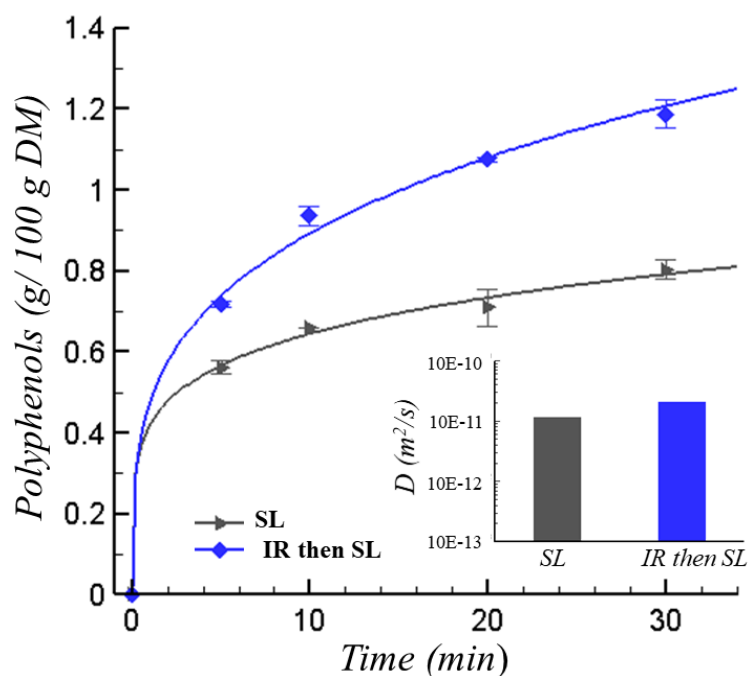


Figure 6. Concentration of polyphenols as a function of solid-liquid extraction time, in 50% ethanol-water at 50°C, from untreated and IR pretreated orange peels. Insert shows the diffusion coefficient of polyphenols during solid-liquid extraction from untreated and IR pretreated orange peels.

3.2. Effect of ultrasound assisted extraction

Figure 7a compares the concentrations of polyphenols obtained from fresh orange peels, after solid-liquid extraction and ultrasound assisted extraction. In both cases, the concentration of extracted polyphenols increased continuously with the time. A significant positive effect of ultrasounds was observed: ≈ 0.8 g/100 g DM of polyphenols were obtained with the conventional SL extraction against 1.30 g/100 g DM with US assisted extraction after 30 min. Acoustic cavitation produced in the solvent by ultrasound waves, causes the disruption of the cell wall structure and accelerates the diffusion through the membranes (Aguilo-Aguayo, Walton, Vinas, & Tiwari, 2017). Cavitation process also provokes a swelling of the cells and an enlargement of the pores, which allows a higher absorption of the solvent and a higher diffusivity across the cell walls (D'Alessandro, Kriaa, Nikov, & Dimitrov, 2012). Insert shows the improvement induced by US compared to solid-liquid extraction. It can be observed the high effect of ultrasounds that reached a maximum value of 64% for 20 min of US treatment. The ultrasonic effect enhances mass transport by altering the plant materials and modifying their physical and chemical properties which facilitates the release of extractable compounds (Bonfigli, Godoy, Reinheimer, & Scenna, 2017).

Figure 7b compares the SL extraction of polyphenols from IR pretreated orange peels and the US assisted extraction from fresh orange peels. This experiment shows the advantage of the IR pretreatment to improve the concentrations of polyphenols obtained after SL extraction. It also allows to observe if the IR pre-treatment of the peels followed by SL extraction will give concentrations in polyphenols close to those obtained with US treatment of fresh peels. After 30 min of extraction, 1.18 g/100 g DM of polyphenols were obtained with SL extraction from IR pretreated peels against 1.30 g/100 g DM with US from fresh peels. This result shows the efficiency of the pre-treatment step in improving the extraction of polyphenols by the conventional SL extraction. Insert shows that the effect of ultrasound was almost 3 to 8 times lower when orange peels were pretreated with IR before SL extraction. The maximum ultrasound effect (20%) was obtained for 5 min of US treatment and decreased considerably with the time.

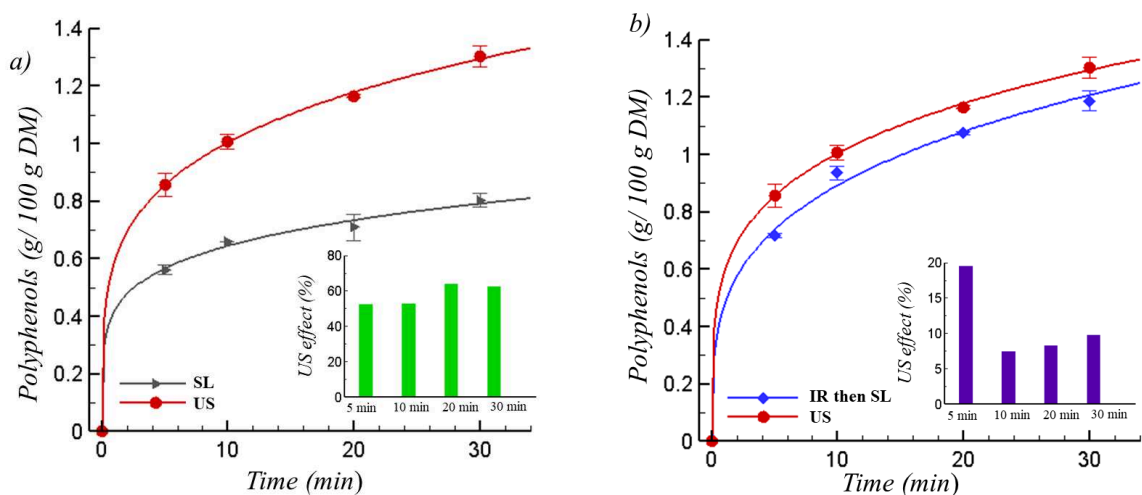


Figure 7. Concentration of polyphenols obtained after US assisted extraction and SL extraction from untreated orange peels (a) and after SL extraction from IR pretreated orange peels compared to US assisted extraction from untreated peels (b). Inserts show the effect of US assisted extraction in percentage of variation.

3.3. Improvement of US assisted extraction by IR pre-treatment of orange peels

In order to maximize the extraction of polyphenols from orange peels, US were applied on IR pretreated orange peels. Figure 8 compares the US extraction of polyphenols from fresh and IR pretreated orange peels. In both cases, the concentration of polyphenols increased with US treatment time. However, for fresh orange peels, the extraction kinetics are low, while for IR pretreated orange peels, there is an acceleration in the increase of polyphenols concentration. After 30 min of US treatment, 1.30 g/100 g DM of polyphenols were obtained from fresh peels and 1.69 g/100 g DM were obtained from IR pre-treated orange peels. Hence the synergistic effect between IR pretreatment and US assisted extraction of polyphenols. Insert shows the diffusivity of polyphenols during US assisted extraction from fresh and pretreated orange peels. The diffusion coefficient of polyphenols increased when orange peels were pretreated. IR pretreatment may increase the internal energy of the molecules which favors their mobility and facilitates their diffusivity during US extraction.

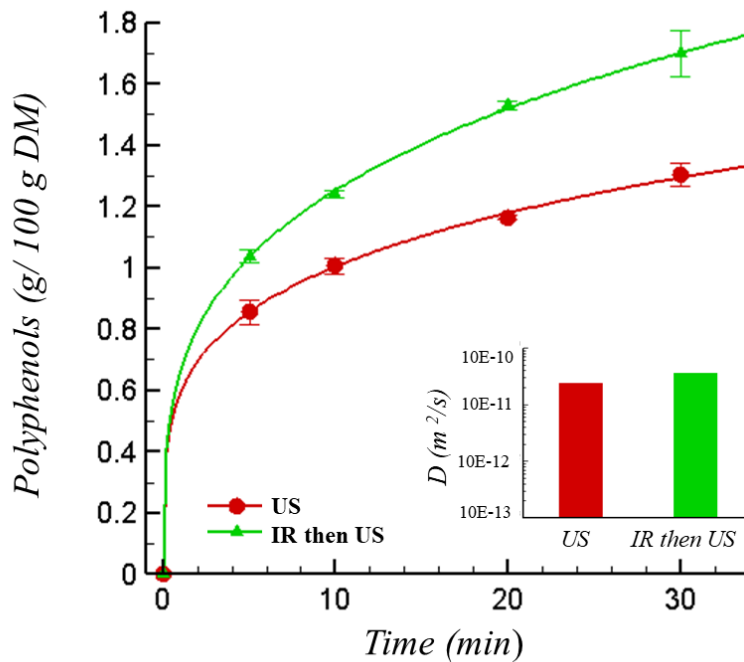


Figure 8. Concentration of polyphenols obtained after ultrasound assisted extraction from untreated and IR pretreated orange peels. Insert shows the diffusion coefficient of polyphenols during US assisted extraction.

Figure 9 shows the inhibition percentage of the free radical DPPH as a function of US assisted extraction time (blue curve) or IR pretreatment time (red curve). First, IR pretreatment time was fixed to 20 min and US were applied on pretreated orange peels from 5 to 30 min (blue curve). Second, IR pretreatment time was varied between 5 and 20 min and US were applied at a fix duration of 30 min on pretreated orange peels (red curve). The inhibition percentage represents the free radical scavenging activity of the extracted polyphenols. It is important to maintain polyphenols bioactive properties, amongst which antiradical activity, after the extraction process. The free radical scavenging activities were higher when the US treatment was fixed at 30 min. The optimal inhibition percentage of the free radical DPPH, was obtained with 10 min of IR pretreatment followed by a fixed duration of US (30 min). Polyphenols were stable even when the pretreatment and treatment duration were long.

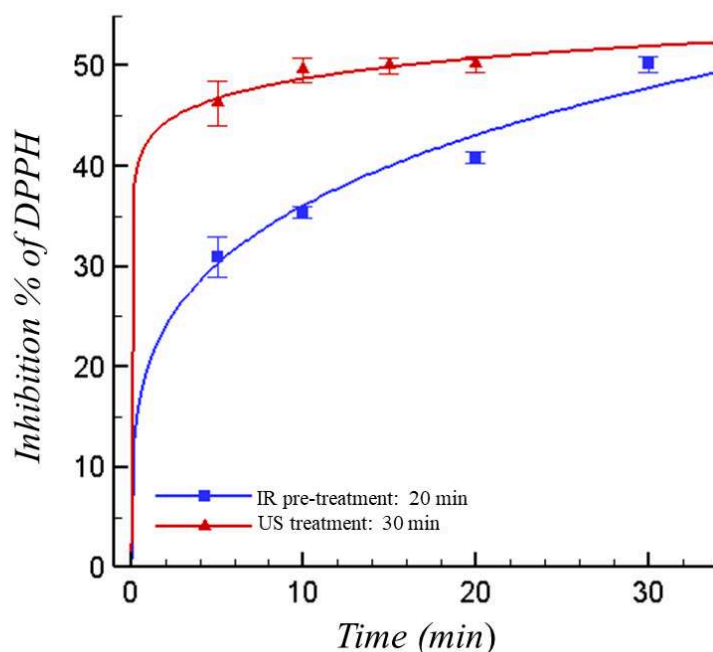


Figure 9. Inhibition % of the free radical DPPH as a function of the different IR and US combinations. The blue curve corresponds to an IR pre-treatment duration of 20 min followed by a variable duration of US treatment (between 5 and 30 min). The red curve corresponds to a variable IR pre-treatment duration (between 5 and 20 min) followed by 30 min of US treatment.

Figure 10 (a and b) compares the different combinations of pre-treatment of orange peels with IR and the extraction of polyphenols with US in terms of the extracted polyphenols. The values in the bars show the total energy consumption in kJ / kg. It can be observed that the energy consumption is lower when the IR pretreatment was fixed at 20 min and the duration of the US was varied between 5 and 30 min. The same concentration of polyphenols 1.24 g / 100 g MS was obtained after 20 min of IR followed by 10 min of US and after 5 min of IR followed by 30 min of US with an energy consumption of 170 kJ/kg and 290 kJ/kg respectively. The polyphenols concentration (1.53 g/100 g DM) obtained after 20 min of IR pretreatment followed by 20 min of US was 10% higher than that obtained after 15 min of IR pretreatment followed by 30 min of US (1.38 g/100 g DM). In this case, the treatment duration and the energy consumption were respectively 12% and 27% lower. It is therefore more advantageous in terms of energy consumption and polyphenols concentrations, to enhance the duration of the IR pretreatment time in order to intensify the US assisted extraction of polyphenols. Figure 10c shows the energy required to obtain 1 g of polyphenols as a function of the different applied treatments. The most efficient combination of IR and US in terms of energy consumption is 20 min of IR pretreatment followed by 5 min of US. This shows the importance of the pretreatment step and the efficiency of IR as an energy saving

method.

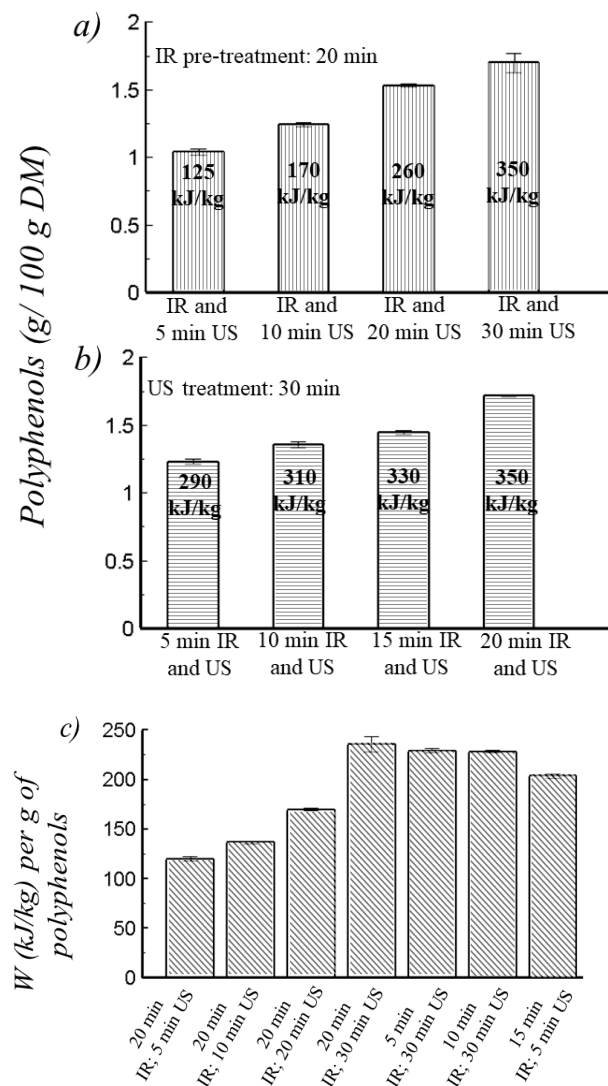


Figure 10. Concentration of polyphenols obtained after 20 min of IR pre-treatment and a variable duration of US treatment (a), and after a variable duration of IR pre-treatment followed by 30 min of US treatment (b). The values in the bars show the total energy consumption during IR pre-treatment and US treatment in kJ / kg. Figure 10 (c) presents the energy (kJ/kg) required to extract one gram of polyphenols as a function of different treatments combinations.

4. Conclusions

In this study, conventional solid-liquid extraction and ultrasounds were used for the extraction of polyphenols from orange peels. Ultrasounds enhanced the extraction of polyphenols by 1.6 times comparing to solid-liquid extraction. Infrared pretreatment, a simple and low-cost method has shown its effectiveness in improving the polyphenol diffusivities by both

conventional solid-liquid extraction and ultrasounds. The combined effect of both IR pre-treatment and US treatment showed a positive influence on polyphenols quantity and quality from orange peels. The total energy required to obtain 1 g of polyphenols was 120 kJ/kg for 20 min of IR pre-treatment followed by 5 min of US and 229 kJ/kg for 5 min of IR pre-treatment followed by 30 min of US. Therefore, it is more advantageous in terms of energy consumption to enhance the duration of IR pre-treatment and to reduce the duration of the subsequent ultrasound-assisted extraction. Infrared technology is an efficient energy saving method that can be used more frequently, for the treatment of the plant material in the processes of extraction of bioactive molecules.

References

- Aguilo-Aguayo, I., Walton, J., Vinas, I., & Tiwari, B. K. (2017). Ultrasound assisted extraction of polysaccharides from mushroom by-products. *LWT - Food Science and Technology*, 77, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.043>
- Al-Dhabi, N. A., Ponmurugan, K., & Maran Jeganathan, P. (2017). Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.05.005>
- Altemimi, A., Choudhary, R., Watson, D. G., & Lightfoot, D. A. (2015). Effects of ultrasonic treatments on the polyphenol and antioxidant content of spinach extracts. *Ultrasonics Sonochemistry*, 24, 247–255. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.10.023>
- Bagherian, H., Zokaee Ashtiani, F., Fouladitajar, A., & Mohtashamy, M. (2011). Comparisons between conventional, microwave- and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 50(11–12), 1237–1243. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2011.08.002>
- Bonfigli, M., Godoy, E., Reinheimer, M. A., & Scenna, N. J. (2017). Comparison between conventional and ultrasound-assisted techniques for extraction of anthocyanins from grape pomace. Experimental results and mathematical modeling. *Journal of Food Engineering*, 207, 56–72. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.03.011>
- Cai, Y., Yu, Y., Duan, G., & Li, Y. (2011). Study on infrared-assisted extraction coupled with high performance liquid chromatography (HPLC) for determination of catechin, epicatechin, and procyanidin B2 in grape seeds. *Food Chemistry*, 127(4), 1872–1877.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.026>

Carrera, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2012). Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta*, 732, 100–104. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.032>

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>

Chemat, F., Zill-E-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813–835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>

D'Alessandro, G. L., Kriaa, K., Nikov, I., & Dimitrov, K. (2012). Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and Purification Technology*, 93, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.03.024>

De Moraes Barros, H. R., De Castro Ferreira, T. A. P., & Genovese, M. I. (2012). Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. *Food Chemistry*, 134(4), 1892–1898. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.090>

Hegazy, A. E., & Ibrahim, M. I. (2012). Antioxidant activities of orange peel extracts. *World Applied Sciences Journal*, 18(5), 684–688. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2012.18.05.64179>

Herrera, M. C., & Luque De Castro, M. D. (2005). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, 1100(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.09.021>

Ikegwu, O. J., Ekwu, F. C., & others. (2009). Thermal and physical properties of some tropical fruits and their juices in Nigeria. *Journal of Food Technology*, 7(2), 38–42.

Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Dangles, O., & Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 119(2), 851–858.
201

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.046>

Khoei, M., & Chekin, F. (2016). The ultrasound-assisted aqueous extraction of rice bran oil. *Food Chemistry*, 194, 503–507. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.068>

Koubaa, M., Mhemdi, H., Barba, F. J., Roohinejad, S., Greiner, R., & Vorobiev, E. (2016). Oilseed treatment by ultrasounds and microwaves to improve oil yield and quality: An overview. *Food Research International*, 85, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.007>

Kratchanova, M., Pavlova, E., & Panchev, I. (2004). The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin. *Carbohydrate Polymers*, 56(2), 181–185. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.01.009>

Lagha-Benamrouche, S., & Madani, K. (2013). Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*, 50, 723–730. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.048>

Li, H., Pordesimo, L., & Weiss, J. (2004). High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Research International*, 37(7), 731–738. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.02.016>

Li, Y., Dai, Y., Du, W., Zhao, C., Wang, H., Wang, L., ... Li, N. (2006). Cloned endangered species takin (*Budorcas taxicolor*) by inter-species nuclear transfer and comparison of the blastocyst development with yak (*Bos grunniens*) and bovine. *Molecular Reproduction and Development*, 73(2), 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2005.07.019>

Londoño-Londoño, J., Lima, V. R. de, Lara, O., Gil, A., Pasa, T. B. C., Arango, G. J., & Pineda, J. R. R. (2010). Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method. *Food Chemistry*, 119(1), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.075>

M'hiri, N., Ioannou, I., Mihoubi Boudhrioua, N., & Ghoul, M. (2015). Effect of different operating conditions on the extraction of phenolic compounds in orange peel. *Food and Bioproducts Processing*, 96, 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.07.010>

Qu, Y., Li, C., Zhang, C., Zeng, R., & Fu, C. (2016). Optimization of infrared-assisted

extraction of *Bletilla striata* polysaccharides based on response surface methodology and their antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*, 148, 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.081>

Rezzadori, K., Benedetti, S., & Amante, E. R. (2012). Proposals for the residues recovery: Orange waste as raw material for new products. *Food and Bioproducts Processing*, 90(4), 606–614. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.06.002>

Roselló-Soto, E., Koubaa, M., Moubarik, A., Lopes, R. P., Saraiva, J. A., Boussetta, N., ... Barba, F. J. (2015). Emerging opportunities for the effective valorization of wastes and by-products generated during olive oil production process: Non-conventional methods for the recovery of high-added value compounds. *Trends in Food Science and Technology*, 45(2), 296–310. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.003>

Wang, S., Zhang, L., Yang, P., & Chen, G. (2008). Infrared-assisted tryptic proteolysis for peptide mapping. *Proteomics*, 8(13), 2579–2582. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800086>

Zhang, Z., Wang, L., Li, D., Jiao, S., Dong, X., & Mao, Z. (2008). Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed, 62, 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.01.014>

Conclusions et Perspectives

Ces travaux de thèse portent sur la valorisation des peaux d'agrumes, les principaux coproduits résultant de la transformation des agrumes, à travers leur contenu en polyphénols.

Dans un premier temps, les rendements en jus d'agrumes et leur contenu en polyphénols ont été améliorés en traitant les agrumes entiers (oranges, citrons et pamplemousses) avec les champs électriques pulsés (CEP). L'effet des CEP sur l'endommagement cellulaire et la composition phénolique des peaux d'agrumes a été étudié. Ensuite, différentes méthodes et technologies d'extraction thermiques telles que les infrarouges (IR) et les microondes (MO) et non thermiques telles que les ultrasons (US) et les décharges électriques de haute tension (DEHT) ont été utilisées pour la valorisation des peaux d'agrumes résultant du processus du pressage. Des solvants verts alternatifs aux solvants organiques et plusieurs nouveaux solvants ont été formulés et testés. Différentes méthodes de prétraitement comme les MO, les DEHT et les IR ont permis d'améliorer les procédés d'extraction.

Le traitement des fruits entiers par les CEP (16-44 kJ/kg) a augmenté les rendements en jus obtenus après le pressage de 12% (48% à 60%) pour l'orange, de 20% (54% à 74%) pour le pomelo et de 24% (39% à 63%) pour le citron. Les CEP ont permis le passage des polyphénols des cellules de l'albédo dans le jus, ce qui a amélioré les contenus phénoliques des jus d'oranges, de pomelos et de citrons respectivement de 39%, 66% et 135%. L'endommagement induit par les CEP a été évalué par le calcul des indices de désintégration acoustique (Z_a), de conductivité électrique (Z_c) et de texturométrie (Z_t). Les degrés d'endommagement sont différents entre les types d'agrumes, allant des endommagements les plus faibles pour les citrons ($Z_a=0,84$; $Z_c=0,65$; $Z_t=0,55$) suivis des pomelos ($Z_a=0,93$; $Z_c=0,80$; $Z_t=0,80$) et enfin des taux d'endommagements maximaux pour les oranges ($Z_a=0,94$; $Z_c=0,94$; $Z_t=0,97$). Une tendance inverse est observée entre l'augmentation des rendements en jus et en polyphénols dans le jus et les taux d'endommagement. Ce résultat peut être expliqué par les différences de perméabilité des structures cellulaires de chaque fruit. Les polyphénols majoritaires dans les peaux d'oranges (hespéridine), de pomelos (naringine) et de citrons (ériocitrine) ont été caractérisés par des analyses HPLC.

Les DEHT sont la deuxième technologie électrique utilisée pour l'intensification de l'extraction des molécules bioactives à partir des peaux d'agrumes. Dans un premier temps, les peaux de pamplemousses ont été prétraitées par les DEHT afin d'améliorer l'extraction des polyphénols dans les solvants verts. Le mélange 20% glycérol-eau et le solvant eutectique profond (acide lactique : glucose) ont amélioré l'extraction des polyphénols totaux de 1,68 g/100 g MS (dans l'eau) jusqu'à 1,86 g/100 g MS et 1,93 g/100 g MS respectivement, après 10 min de diffusion, à partir des peaux de pamplemousses prétraitées dans l'eau par les DEHT (72 kJ/kg). La solubilité de la naringine, (le flavonoïde majoritaire des peaux de pamplemousses) dans ces solvants a été étudiée par une modélisation théorique de leurs paramètres selon la méthode de Hansen. Dans un second temps, la combinaison des DEHT avec l'hydrolyse enzymatique a été évaluée. Le prétraitement des peaux d'oranges avec les MO sans solvant (1200 kJ/kg) a amélioré l'extraction des polyphénols avec les DEHT (222 kJ/kg) jusqu'à 0,7 g/100g MS. L'application des DEHT comme prétraitement à l'hydrolyse enzymatique a amélioré les cinétiques et les rendements d'extraction des polyphénols. Les analyses de granulométrie ont montré la diminution de la taille des peaux d'oranges (jusqu'à 10 fois) en augmentant l'énergie du traitement avec les DEHT de 44 à 448 kJ/kg. La fragmentation des peaux durant les DEHT a facilité l'accès des enzymes à leur substrat durant l'hydrolyse enzymatique. Etant donné que les sucres sont les substrats des enzymes, le dosage des sucres réducteurs dans les extraits a été réalisé. Le prétraitement des peaux d'oranges par les DEHT a permis d'obtenir des rendements maximaux en sucres réducteurs (40 g/100 g MS) dans les premières minutes de l'hydrolyse enzymatique. Le mélange d'enzymes a permis l'hydrolyse des sucres complexes et par conséquent une extraction plus intense des sucres fermentescibles en bioéthanol.

Le chauffage par les infrarouges a été ensuite testé pour l'extraction des polyphénols à partir des peaux d'agrumes. Dans les conditions optimales d'extraction des polyphénols, les IR (1,97 g/100g MS) ont montré plusieurs avantages par rapport à l'extraction SL conventionnelle (1,67 g/100g MS), surtout au niveau de la consommation du solvant et de la durée d'extraction. Le prétraitement des peaux d'oranges avec les IR sans solvant (80 kJ/kg) a augmenté les rendements d'extraction en polyphénols avec les US (270 kJ/kg) de 1,30 g/100 g MS jusqu'à 1,7 g/100g MS.

L'activité biologique des polyphénols extraits à partir des peaux d'oranges, dans les conditions optimales avec l'extraction SL et avec les IR a été déterminée. L'effet des polyphénols sur

l'inhibition du champignon *Aspergillus flavus* a été faible (SL : 11,8% et IR : 15,8%). Cependant leur effet a été remarquable sur l'inhibition de la production de la mycotoxine (Aflatoxine B1) par ce même champignon (SL : 99,4% et IR : 98,9%).

Pour récapituler, nous avons tenté dans cette thèse d'améliorer l'extraction des polyphénols à partir des peaux d'agrumes. L'effet du traitement des agrumes entiers par les CEP avant l'extraction du jus et des polyphénols par pressage (extraction sans solvant) a été étudié. L'extraction a été ensuite effectuée dans des solvants verts ou dans un mélange enzymatique. Les DEHT ont été testées comme méthode de prétraitement des peaux d'agrumes pour améliorer les cinétiques et les rendements d'extraction des molécules bioactives dans les différents solvants. Le prétraitement des peaux d'agrumes par les DEHT a permis la fragmentation des peaux d'agrumes, ce qui a amélioré l'étape suivante d'extraction dans les solvants eutectiques profonds, le mélange glycérol-eau et le mélange enzymatique. L'extraction par le chauffage IR a été optimisée et comparée avec l'extraction solide-liquide conventionnelle. L'effet du prétraitement des peaux d'agrumes avec les IR ou les MO sans solvant sur l'augmentation des cinétiques et des rendements d'extraction a été étudié. Les résultats de ce travail de thèse conduisent à de nouvelles pistes de recherche inexploitées.

Des résultats intéressants ont été obtenus lorsque les agrumes entiers ont été prétraités avec les CEP avant leur pressage. Cependant, une chambre de pressage simple a été utilisée à l'échelle laboratoire. Il est donc nécessaire d'étudier l'effet des CEP à l'échelle pilote, avec une adaptation et une optimisation approfondies en fonction des techniques de pressage et des produits utilisés.

La localisation des polyphénols dans les peaux d'agrumes pour les fruits intacts ou traités avec les CEP, et la microscopie électronique sur le flavédo et l'albédo des peaux d'agrumes ont permis de déterminer sur quelle partie des peaux agissent les CEP. Cette étude n'a pas été réalisée avec les autres techniques d'extraction. Cependant, la localisation détaillée des polyphénols avant et après leur traitement avec les US, les DEHT, et les IR pourrait optimiser les rendements d'extraction et diminuer le coût des procédés. Les effets des méthodes de traitement et de prétraitement pourront être observés à l'échelle microscopique, dans le but de vérifier et de mieux comprendre le potentiel de chaque technologie sur l'endommagement membranaire.

Au niveau de l'extraction des polyphénols avec les IR, un besoin de connaissances de leur mécanisme d'action est nécessaire pour améliorer davantage l'efficacité de ce traitement.

Des études approfondies sur les solvants eutectiques profonds sont essentielles pour l'optimisation de l'extraction avec ces solvants. Les pourcentages d'eau ajoutés à ces solvants changent leur viscosité et leur polarité. L'optimisation de ces pourcentages en fonction de la nature des polyphénols présents dans les peaux d'agrumes, permettra une amélioration importante des rendements en polyphénols extraits.

Il est aussi important :

- D'approfondir les connaissances sur les liaisons qui s'établissent entre les solvants eutectiques profonds et les polyphénols des peaux d'agrumes. Cela aidera à sélectionner le meilleur solvant pour chaque type d'agrumes en fonction de la nature des polyphénols.
- D'étudier l'effet des technologies innovantes (IR/DEHT/CEP/US) sur les solvants eutectiques profonds afin de voir les possibilités de l'application de ces méthodes d'extraction directement dans les solvants verts.
- De comparer la bioactivité des polyphénols extraits avec les différentes technologies (DEHT/CEP/US/IR) afin de voir l'effet de chaque méthode d'extraction sur la qualité des polyphénols extraits.
- De purifier et de concentrer les polyphénols des extraits de peaux d'agrumes obtenus par les différentes technologies, afin de comparer les effets des différentes méthodologies d'extraction sur la pureté des extraits, selon la sélectivité du procédé d'extraction envers les polyphénols au dépit des autres molécules bioactives.

Références Bibliographiques

- Achat, S. (2014). Polyphénols de l'alimentation : extraction , pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. Thèse de Doctorat.
- Adda, P. (2018). Décharges Électriques Impulsionnelles dans l'Eau : Mécanismes , Effets Physiques , et Application à l'Extraction de Polyphénols à partir des Pépins de Raisin . Thèse de Doctorat.
- Aguiló-Aguayo, I., Walton, J., Viñas, I., & Tiwari, B. K. (2017). Ultrasound assisted extraction of polysaccharides from mushroom by-products. *LWT - Food Science and Technology*, 77, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.043>
- Aissou, M., Chemat-djenni, Z., & Chemat, F. (2017). Limonene as an agro-chemical building block for the synthesis and extraction of bioactive compounds. *Comptes Rendus Chimie*. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2016.05.018>
- Allaf, T., Tomao, V., Ruiz, K., & Chemat, F. (2013). Instant controlled pressure drop technology and ultrasound assisted extraction for sequential extraction of essential oil and antioxidants. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.05.013>
- Almohammed, F., Koubaa, M., Khelfa, A., Nakaya, M., Mhemdi, H., & Vorobiev, E. (2017). Pectin recovery from sugar beet pulp enhanced by high-voltage electrical discharges. *Food and Bioproducts Processing*, 103, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.03.005>
- Anagnostopoulou, M. A., Kefalas, P., Papageorgiou, V. P., Assimopoulou, A. N., & Boskou, D. (2006). Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food Chemistry*, 94(1), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.047>
- Antoine, S. (2014). Etude des mecanismes de l'acidification de la pulpe des agrumes en conditions d'assimilats contrastes. Thèse de Doctorat.
- Apostolakis, A., Grigorakis, S., & Makris, D. P. (2014). Optimisation and comparative kinetics study of polyphenol extraction from olive leaves (*Olea europaea*) using heated water/glycerol

- mixtures. *Separation and Purification Technology*, 128, 89–95.
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.03.010>
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Bajkacz, S., & Adamek, J. (2017). Evaluation of new natural deep eutectic solvents for the extraction of isoflavones from soy products. *Talanta*, 168(August 2016), 329–335.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.02.065>
- Bakirtzi, C., Triantafyllidou, K., & Makris, D. P. (2016). Novel lactic acid-based natural deep eutectic solvents: Efficiency in the ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from common native Greek medicinal plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 3(3), 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.03.003>
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Barba, F. J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Ana, A. S., & Orlie, V. (2016). Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 49, 96–109.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.006>
- Bazhal, M., & Vorobiev, E. (2000). Electrical treatment of apple cossettes for intensifying juice pressing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(11), 1668–1674.
[https://doi.org/10.1002/1097-0010\(20000901\)80:11<1668::AID-JSFA692>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0010(20000901)80:11<1668::AID-JSFA692>3.0.CO;2-7)
- Bi, W., Tian, M., & Row, K. H. (2013). Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. *Journal of Chromatography A*, 1285, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.041>
- Bittar, S. Al, Perino-Issartier, S., Dangles, O., & Chemat, F. (2013). An innovative grape juice enriched in polyphenols by microwave-assisted extraction. *Food Chemistry*, 141(3), 3268–

3272. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.134>

Bobinaitė, R., Pataro, G., Lamanauskas, N., Šatkauskas, S., Viškelis, P., & Ferrari, G. (2015). Application of pulsed electric field in the production of juice and extraction of bioactive compounds from blueberry fruits and their by-products. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5898–5905. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1668-0>

Boluda-Aguilar, M., & López-Gómez, A. (2013). Production of bioethanol by fermentation of lemon (*Citrus limon* L.) peel wastes pretreated with steam explosion. *Industrial Crops and Products*, 41(1), 188–197. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.031>

Bonfigli, M., Godoy, E., Reinheimer, M. A., & Scenna, N. J. (2017). Comparison between conventional and ultrasound-assisted techniques for extraction of anthocyanins from grape pomace. Experimental results and mathematical modeling. *Journal of Food Engineering*, 207, 56–72. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.03.011>

Boukroufa, M., Boutekedjiret, C., Petigny, L., Rakotomanomana, N., & Chemat, F. (2015). Bio-refinery of orange peels waste: A new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin. *Ultrasonics Sonochemistry*, 24, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.11.015>

Bousbia, N. (2011). Extraction des antioxydants à partir de produits naturels et de co-produits alimentaires. Thèse de Doctorat.

Bousbia, N., Vian, M. A., Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., & Chemat, F. (2009). A new process for extraction of essential oil from Citrus peels: Microwave hydrodiffusion and gravity. *Journal of Food Engineering*, 90(3), 409–413. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.06.034>

Boussetta, N., Lanoisellé, J. L., Bedel-Cloutour, C., & Vorobiev, E. (2009). Extraction of soluble matter from grape pomace by high voltage electrical discharges for polyphenol recovery: Effect of sulphur dioxide and thermal treatments. *Journal of Food Engineering*, 95(1), 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.04.030>

Boussetta, N., Turk, M., De Taeye, C., Larondelle, Y., Lanoisellé, J. L., & Vorobiev, E. (2013). Effect of high voltage electrical discharges, heating and ethanol concentration on the

- extraction of total polyphenols and lignans from flaxseed cake. *Industrial Crops and Products*, 49, 690–696. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.004>
- Boussetta, N., & Vorobiev, E. (2014). Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: A review. *Comptes Rendus Chimie*, 17(3), 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2013.11.011>
- Boussetta, N., Vorobiev, E., Deloison, V., Pochez, F., Falcimaigne-Cordin, A., & Lanoisellé, J. L. (2011). Valorisation of grape pomace by the extraction of phenolic antioxidants: Application of high voltage electrical discharges. *Food Chemistry*, 128(2), 364–370. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.035>
- Boussetta, N., Vorobiev, E., Le, L. H., Cordin-Falcimaigne, A., & Lanoisellé, J. L. (2012). Application of electrical treatments in alcoholic solvent for polyphenols extraction from grape seeds. *LWT - Food Science and Technology*, 46(1), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.10.016>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Bubalo, C. M., Ćurko, N., Tomašević, M., Kovačević Ganić, K., & Radojčić Redovniković, I. (2016). Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 200, 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.040>
- Bustamante, J., van Stempvoort, S., García-Gallarreta, M., Houghton, J. A., Briers, H. K., Budarin, V. L., ... Clark, J. H. (2016). Microwave assisted hydro-distillation of essential oils from wet citrus peel waste. *Journal of Cleaner Production*, 137, 598–605. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.07.108>
- Cai, Y., Yu, Y., Duan, G., & Li, Y. (2011). Study on infrared-assisted extraction coupled with high performance liquid chromatography (HPLC) for determination of catechin, epicatechin, and procyanidin B2 in grape seeds. *Food Chemistry*, 127(4), 1872–1877. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.026>
- Carrera, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2012). Ultrasound assisted

- extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta*, 732, 100–104. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.032>
- Cendres, A. (2010). Procédé novateur d'extraction de jus de fruits par micro-onde: viabilité de fabrication et qualité nutritionnelle des jus. Thèse de Doctorat. Retrieved from <http://hal.archives-ouvertes.fr/tel-00557288/>
- Cendres, A., Chemat, F., Page, D., Le Bourvellec, C., Markowski, J., Zbrzezniak, M., ... Plocharski, W. (2012). Comparison between microwave hydrodiffusion and pressing for plum juice extraction. *LWT - Food Science and Technology*, 49(2), 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.06.027>
- Chandrapala, J., Oliver, C., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2012). Ultrasonics Sonochemistry Ultrasonics in food processing. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 19(5), 975–983. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.01.010>
- Chandrasekaran, S., Ramanathan, S., & Basak, T. (2013). Microwave food processing-A review. *Food Research International*, 52(1), 243–261. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.033>
- Cheaib, D., El, N., Hiba, D., Iman, N. R., Ghazzawi, E., Maroun, R. G., & Louka, N. (2018). Biological activity of apricot byproducts polyphenols using solid – liquid and infrared-assisted technology, (October 2017), 1–9. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12552>
- Chemat, F., Fabiano-Tixier, A. S., Vian, M. A., Allaf, T., & Vorobiev, E. (2015). Solvent-free extraction of food and natural products. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 71, 157–168. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.021>
- Chemat, F., Rombaut, N., Meullemiestre, A., Turk, M., Perino, S., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Review of Green Food Processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 41(May), 357–377. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.04.016>
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>

- Chen, Q., Liu, T., & Chen, G. (2011). Highly Efficient Proteolysis Accelerated by Electromagnetic Waves for Peptide Mapping. *Current Genomics*, 12(6), 380–390. <https://doi.org/10.2174/138920211797248583>
- Choi, I. S., Lee, Y. G., Khanal, S. K., Park, B. J., & Bae, H. J. (2015). A low-energy, cost-effective approach to fruit and citrus peel waste processing for bioethanol production. *Applied Energy*, 140, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.11.070>
- Cissé, M. (2010). Coulage de procédés membranaires pour la production d'extraits anthocyaniques: Application à l'Hibiscus sabdariffa. Thèse de Doctorat.
- Crank, J. (1975). *The Mathematics of Diffusion*: 2d Ed. [https://doi.org/10.1016/0306-4549\(77\)90072-X](https://doi.org/10.1016/0306-4549(77)90072-X)
- D'Alessandro, G. L., Kriaa, K., Nikov, I., & Dimitrov, K. (2012). Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and Purification Technology*, 93, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.03.024>
- Da Porto, C., Porretto, E., & Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(4), 1076–1080. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.12.002>
- Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 766, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.019>
- de Vito, F., Ferrari, G., Lebovka, N. I., Shynkaryk, N. V., & Vorobiev, E. (2008). Pulse duration and efficiency of soft cellular tissue disintegration by pulsed electric fields. *Food and Bioprocess Technology*, 1(4), 307–313. <https://doi.org/10.1007/s11947-007-0017-y>
- Duan, H., Chen, Y., & Chen, G. (2010). Far infrared-assisted extraction followed by capillary electrophoresis for the determination of bioactive constituents in the leaves of *Lycium barbarum* Linn. *Journal of Chromatography A*, 1217(27), 4511–4516. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.04.069>
- Duan, L., Dou, L.-L., Guo, L., Li, P., & Liu, E.-H. (2016). Comprehensive Evaluation of Deep

- Eutectic Solvents in Extraction of Bioactive Natural Products. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(4), 2405–2411. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b00091>
- Dugrand-Judek, A. (2015). Contribution à l'étude phytochimique et moléculaire de la synthèse des coumarines et furocoumarines chez diverses variétés d'agrumes du genre *Citrus*. Thèse de Doctorat.
- Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., & Chemat, F. (2007). Comparison of different isolation methods of essential oil from *Citrus* fruits: Cold pressing, hydrodistillation and microwave “dry” distillation. *Flavour and Fragrance Journal*, 22(6), 494–504. <https://doi.org/10.1002/ffj.1829>
- Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., Smadja, J., & Chemat, F. (2006). An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. *Journal of Chromatography A*, 1112(1–2), 121–126. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.030>
- Fincan, M., & Dejmek, P. (2002). In situ visualization of the effect of a pulsed electric field on plant tissue. *Journal of Food Engineering*, 55(3), 223–230. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00079-1](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00079-1)
- Fincan, M., & Dejmek, P. (2003). Effect of osmotic pretreatment and pulsed electric field on the viscoelastic properties of potato tissue. *Journal of Food Engineering*, 59(2–3), 169–175. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00454-5](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00454-5)
- Fuente-blanco, S. De, & Sarabia, E. R. De. (2006). Food drying process by power ultrasound, 44, 523–527. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2006.05.181>
- Galanakis, C. M. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science and Technology*, 26(2), 68–87. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.03.003>
- García, A., Rodríguez-Juan, E., Rodríguez-Gutiérrez, G., Rios, J. J., & Fernández-Bolaños, J. (2016). Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESs). *Food Chemistry*, 197, 554–561. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.131>
- Ghasemi, K., Ghasemi, Y., & Ebrahimzadeh, M. A. (2009). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pakistan Journal of Pharmaceutical*

Sciences, 22(3), 277–281.

Grigoras, C.-G. (2012). Valorisation des fruits et des sous-produits de l'industrie de transformation des fruits par extraction des composés bioactifs. Thèse de Doctorat.

Grimi, N. (2009). Vers l'intensification du pressage industriel des agroressources par champs électriques pulsés : étude multi-échelles.

Grimi, N., Mamouni, F., Lebovka, N., Vorobiev, E., & Vaxelaire, J. (2010). Acoustic impulse response in apple tissues treated by pulsed electric field. *Biosystems Engineering*, 105(2), 266–272. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2009.11.005>

Grimi, N., Mamouni, F., Lebovka, N., Vorobiev, E., & Vaxelaire, J. (2011). Impact of apple processing modes on extracted juice quality: Pressing assisted by pulsed electric fields.

Grimi, N., Praporscic, I., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2007). Selective extraction from carrot slices by pressing and washing enhanced by pulsed electric fields. *Separation and Purification Technology*, 58(2), 267–273. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.03.020>

Grohmann, K., Baldwin, E. a., & Buslig, B. S. (1994). Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed orange peel by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 45–46(1), 315–327. <https://doi.org/10.1007/BF02941808>

Groppo, M., Pirani, J. R., Salatino, M. L. F., Blanco, S. R., & Kallunki, J. A. (2008). Phylogeny of Rutaceae based on two noncoding regions from cpDNA. *American Journal of Botany*, 95(8), 985–1005. <https://doi.org/10.3732/ajb.2007313>

Guo, X., Han, D., Xi, H., Rao, L., Liao, X., Hu, X., & Wu, J. (2012). Extraction of pectin from navel orange peel assisted by ultra-high pressure, microwave or traditional heating: A comparison. *Carbohydrate Polymers*, 88(2), 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.026>

Häckl, K., & Kunz, W. (2018). Some aspects of green solvents. *Comptes Rendus Chimie*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2018.03.010>

Hegazy, A. E., & Ibrahim, M. I. (2012). Antioxidant activities of orange peel extracts. *World Applied Sciences Journal*, 18(5), 684–688.

<https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2012.18.05.64179>

Herrero, M., & Ibañez, E. (2018). Green extraction processes, biorefineries and sustainability: Recovery of high added-value products from natural sources. *Journal of Supercritical Fluids*, 134(December 2017), 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.12.002>

Huang, Y., Feng, F., Jiang, J., Qiao, Y., Wu, T., Voglmeir, J., & Chen, Z. G. (2017). Green and efficient extraction of rutin from tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 221, 1400–1405. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.013>

Ignat, I., Volf, I., & Popa, I. V. (2011). Standardization of ashwagandharishta formulation by TLC method. *International Journal of ChemTech Research*, 3(3), 1033–1036. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>

Jaeger, H., Schulz, M., Lu, P., & Knorr, D. (2012). Adjustment of milling, mash electroporation and pressing for the development of a PEF assisted juice production in industrial scale. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 14, 46–60. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.11.008>

Jovanović, A. A., Đorđević, V. B., Zdunić, G. M., Pljevljakušić, D. S., Šavikin, K. P., Gođevac, D. M., & Bugarski, B. M. (2017). Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. *Separation and Purification Technology*, 179, 369–380. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.01.055>

Karakashov, B., Grigorakis, S., Loupassaki, S., & Makris, D. P. (2015). Optimisation of polyphenol extraction from *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) using aqueous glycerol and response surface methodology. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2014.11.002>

Khan, M. K. (2010). Polyphénols d'Agrumes (flavanones) : extraction de glycosides de la peau d'orange, synthèse de métabolites chez l'homme (glucuronides) et étude physico-chimique de leur interaction avec la sérum albumine. Thèse de Doctorat.

Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Dangles, O., & Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus*

- sinensis L.) peel. *Food Chemistry*, 119(2), 851–858. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.046>
- Khefifi, H. (2015). Etudes physiologiques et génétiques de caractères morpho-physico-chimiques des fruits d'agrumes au cours de la maturation jusqu'à l'abscission. Thèse de Doctorat.
- Koubaa, M., Barba, F. J., Grimi, N., Mhemdi, H., Koubaa, W., Boussetta, N., & Vorobiev, E. (2016). Recovery of colorants from red prickly pear peels and pulps enhanced by pulsed electric field and ultrasound. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 37, 336–344. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.04.015>
- Koubaa, M., Mhemdi, H., Barba, F. J., Roohinejad, S., Greiner, R., & Vorobiev, E. (2016). Oilseed treatment by ultrasounds and microwaves to improve oil yield and quality: An overview. *Food Research International*, 85, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.007>
- Kpogbemabou, D. (2011). Procédé de fabrication de biocarburants à partir de biomasse lignocellulosique biologiquement déstructurée. Thèse de Doctorat.
- Kratchanova, M., Pavlova, E., & Panchev, I. (2004). The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin. *Carbohydrate Polymers*, 56(2), 181–185. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.01.009>
- Krishnamurthy, K., Khurana, H. K., Jun, S., Irudayaraj, J., Demirci, A., Soojin, J., ... Demirci, A. (2008). in *Food Processing: An Overview. Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*, 7(1), 2–13. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2007.00024.x>
- Kumar, S., & Pandey, K. (2013). Review Article Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World J*, 4(2), 32–48. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750>
- Lebovka, N. I., Bazhal, M. I., & Vorobiev, E. (2002). Estimation of characteristic damage time of food materials in pulsed-electric fields. *Journal of Food Engineering*, 54(4), 337–346. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(01\)00220-5](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(01)00220-5)
- Lebovka, N. I., Praporscic, I., Ghnimi, S., & Vorobiev, E. (2005). Temperature enhanced electroporation under the pulsed electric field treatment of food tissue. *Journal of Food Engineering*, 69(2), 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.08.037>

- Li, B. B., Smith, B., & Hossain, M. M. (2006a). Extraction of phenolics from citrus peels: I. Solvent extraction method. *Separation and Purification Technology*, 48(2), 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2005.07.005>
- Li, B. B., Smith, B., & Hossain, M. M. (2006b). Extraction of phenolics from citrus peels II. Enzyme-assisted extraction method B.B. *Separation and Purification Technology*, 48, 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2005.07.019>
- Li, B., & Sun, D. (2002). Effect of power ultrasound on freezing rate during immersion freezing of potatoes, 55, 277–282.
- Li, Z. (2015). Investigation of deep eutectic solvents and their derivatives for pharmaceutical applications.
- Linares, A. R., Hase, S. L., Vergara, M. L., & Resnik, S. L. (2010). Modeling yerba mate aqueous extraction kinetics: Influence of temperature. *Journal of Food Engineering*, 97(4), 471–477. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.11.003>
- Liu, Y., Heying, E., & Tanumihardjo, S. A. (2012). History, Global Distribution, and Nutritional Importance of Citrus Fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(6), 530–545. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2012.00201.x>
- Londoño-Londoño, J., Lima, V. R. de, Lara, O., Gil, A., Pasa, T. B. C., Arango, G. J., & Pineda, J. R. R. (2010). Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method. *Food Chemistry*, 119(1), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.075>
- Luengo, E., Álvarez, I., & Raso, J. (2013). Improving the pressing extraction of polyphenols of orange peel by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 17, 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.10.005>
- M'hiri, N., Ioannou, I., Mihoubi Boudhrioua, N., & Ghouil, M. (2015). Effect of different operating conditions on the extraction of phenolic compounds in orange peel. *Food and Bioprocess Processing*, 96, 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.07.010>
- Maran, P. J., Sivakumar, V., Thirugnanasambandham, K., & Sridhar, R. (2013). Optimization of microwave assisted extraction of pectin from orange peel. *Carbohydrate Polymers*, 97(2),

703–709. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.05.052>

Michel, T. (2011). Nouvelles méthodologies d' extraction , de fractionnement et d' identification : Application aux molécules bioactives de l'argousier (Hippophaë rhamnoides). Thèse de Doctorat.

Milind, S. L. (2008). Citrus fruit biology, technology and evaluation.

Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

Muanda, F. N. (2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de Doctorat.

Nadar, S. S., Rao, P., & Rathod, V. K. (2018). Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Research International*, 108(March), 309–330. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.006>

Nakajima, V. M., Macedo, G. A., & Macedo, J. A. (2014). Citrus bioactive phenolics: Role in the obesity treatment. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2P2), 1205–1212. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.060>

Nasseri, A. T. (2010). Application & comparison of commercial pectins and Iranian keylime pectin stabilizers in “ doogh ” (drinkable yogurt) making and the study of intra & intermolecular properties of the best pectin type stabilizer. Thèse de Doctorat.

Negro, V., Ruggeri, B., Fino, D., & Tonini, D. (2017). Life cycle assessment of orange peel waste management. *Resources, Conservation and Recycling*, 127(June), 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.08.014>

Ngouémazong, E. D., Christiaens, S., Shpigelman, A., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2015). The Emulsifying and Emulsion-Stabilizing Properties of Pectin: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(6), 705–718. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12160>

Palma, M., & Barroso, C. G. (2002). Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products. *Analytica Chimica Acta*, 458(1),

119–130. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01527-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01527-6)

Parniakov, O., Barba, F. J., Grimi, N., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2014). Impact of pulsed electric fields and high voltage electrical discharges on extraction of high-added value compounds from papaya peels. *Food Research International*, 65(PC), 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.015>

Parniakov, O., Barba, F. J., Grimi, N., Lebovka, N., & Vorobiev, E. (2016). Extraction assisted by pulsed electric energy as a potential tool for green and sustainable recovery of nutritionally valuable compounds from mango peels. *Food Chemistry*, 192, 842–848. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.096>

Poirot, R. (2007). Méthodologie pour le passage en continu d'extraction de soluté à partir de matière végétale. *Journal of Applied Polymer Science*, 100, 3302–3306. Retrieved from <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00000596/01/poirot.pdf>

Pradal, D. (2016). Eco-procédés d'extraction de polyphénols antioxydants à partir d'un co-produit. Thèse de Doctorat.

Pradal, D., Vauchel, P., Decossin, S., Dhulster, P., & Dimitrov, K. (2016). Kinetics of ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from food by-products: Extraction and energy consumption optimization. *Ultrasonics Sonochemistry*, 32, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.03.001>

Praporscic, I., Lebovka, N., Vorobiev, E., & Mietton-Peuchot, M. (2007). Pulsed electric field enhanced expression and juice quality of white grapes. *Separation and Purification Technology*, 52(3), 520–526. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2006.06.007>

Praporscic, I., Shynkaryk, M. V., Lebovka, N. I., & Vorobiev, E. (2007). Analysis of juice colour and dry matter content during pulsed electric field enhanced expression of soft plant tissues. *Journal of Food Engineering*, 79(2), 662–670. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.02.037>

Puértolas, E., Luengo, E., Alvarez, I., & Raso, J. (2012). Improving Mass Transfer to Soften Tissues by Pulsed Electric Fields: Fundamentals and Applications. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101208>

- Putnik, P., Bursac Kovačević, D., Režek Jambrak, A., Barba, F. J., Cravotto, G., Binello, A., ... Shpigelman, A. (2017). Innovative “green” and novel strategies for the extraction of bioactive added value compounds from citruswastes - A review. *Molecules*, 22(5). <https://doi.org/10.3390/molecules22050680>
- Qu, Y., Li, C., Zhang, C., Zeng, R., & Fu, C. (2016). Optimization of infrared-assisted extraction of *Bletilla striata* polysaccharides based on response surface methodology and their antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*, 148, 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.081>
- Rafiq, S., Kaul, R., Sofi, S. A., Bashir, N., Nazir, F., & Ahmad Nayik, G. (2016). Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.07.006>
- Rajha, H. N., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, R. G., & Vorobiev, E. (2014). A comparative study of physical pretreatments for the extraction of polyphenols and proteins from vine shoots. *Food Research International*, 65(PC), 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.024>
- Rajha, H. N., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, R. G., & Vorobiev, E. (2015). Effect of alternative physical pretreatments (pulsed electric field, high voltage electrical discharges and ultrasound) on the dead-end ultrafiltration of vine-shoot extracts. *Separation and Purification Technology*, 146, 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.03.058>
- Rastogi, N. K. (2012). Recent trends and developments in infrared heating in food processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(9), 737–760. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.508138>
- Rezzoug, S. A., & Louka, N. (2009). Thermomechanical process intensification for oil extraction from orange peels. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(4), 530–536. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.05.008>
- Ruiz, B., & Flotats, X. (2014). Citrus essential oils and their influence on the anaerobic digestion process: An overview. *Waste Management*, 34(11), 2063–2079. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.06.026>

- Sahraoui, N., Vian, M. A., El Maataoui, M., Boutekedjiret, C., & Chemat, F. (2011). Valorization of citrus by-products using Microwave Steam Distillation (MSD). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12(2), 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.02.002>
- Santhakumar, A. B., Battino, M., & Alvarez-Suarez, J. M. (2018). Dietary polyphenols: Structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis. *Food and Chemical Toxicology*, 113(January), 49–65. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.022>
- Santi, G., Crognale, S., D'Annibale, A., Petruccioli, M., Ruzzi, M., Valentini, R., & Moresi, M. (2014). Orange peel pretreatment in a novel lab-scale direct steam-injection apparatus for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*, 61, 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.12.007>
- Satari, B., & Karimi, K. (2018). Citrus processing wastes: Environmental impacts, recent advances, and future perspectives in total valorization. *Resources, Conservation and Recycling*, 129(October 2017), 153–167. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.10.032>
- Schieber, A., Stintzing, F., & Carle, R. (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds—recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12(2001), 401–413. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00012-2](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00012-2)
- Sharma, K., Mahato, N., Cho, M. H., & Lee, Y. R. (2017). Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environment friendly approaches. *Nutrition*, 34, 29–46. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.09.006>
- Shirsath, S. R., Sable, S. S., Gaikwad, S. G., Sonawane, S. H., Saini, D. R., & Gogate, P. R. (2017). Intensification of extraction of curcumin from *Curcuma amada* using ultrasound assisted approach: Effect of different operating parameters. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38(March), 437–445. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.03.040>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1998). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Sousa, D. P. De. (2015). Application of ultrasounds for transformation processes To cite this version. Thèse de Doctorat.

- Su, D., Xiao, T., Gu, D., Cao, Y., Jin, Y., Zhang, W., & Wu, T. (2013). Ultrasonic bleaching of rapeseed oil : Effects of bleaching conditions and underlying mechanisms. *Journal of Food Engineering*, 117(1), 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.039>
- Su, H., Tan, F., & Xu, Y. (2016). Enhancement of biogas and methanization of citrus waste via biodegradation pretreatment and subsequent optimized fermentation. *Fuel*, 181, 843–851. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.05.055>
- Taghizadeh-Alisaraei, A., Hosseini, S. H., Ghobadian, B., & Motevali, A. (2017). Biofuel production from citrus wastes: A feasibility study in Iran. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 69(September 2016), 1100–1112. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.09.102>
- Teissié, J., Eynard, N., Vernhes, M. ., Bénichou, A., Ganeva, V., Galutzov, B., & Cabanes, P. . (2002). Recent biotechnological developments of electropulsation . A prospective review, 55, 107–112.
- Tripoli, E., Guardia, M. La, Giammanco, S., Majo, D. Di, & Giammanco, M. (2007). Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*, 104(2), 466–479. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.054>
- Turk, M. (2010). Vers une amélioration du procédé industriel d ’ extraction des fractions solubles de pomme à l ’ aide de technologies électriques. Thèse de Doctorat.
- Turk, M. F., Billaud, C., Vorobiev, E., & Baron, A. (2012). Continuous pulsed electric field treatment of French cider apple and juice expression on the pilot scale belt press. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 14, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.02.001>
- Turk, M., Perino, S., Cendres, A., Petitcolas, E., Soubrat, T., & Chemat, F. (2017). Alternative process for strawberry juice processing: Microwave hydrodiffusion and gravity. *LWT - Food Science and Technology*, 84, 626–633. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.030>
- Van Krevelen, D. W., & Nijenhuis, K. T. (2009). Properties of polymers: their correlation with chemical structure; their numerical estimation and prediction from additive group contributions.
- Vauchel, P., Colli, C., Pradal, D., Philippot, M., Decossin, S., Dhulster, P., & Dimitrov, K. (2018).

- Comparative LCA of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from chicory grounds under different operational conditions. *Journal of Cleaner Production*, 196, 1116–1123. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.06.042>
- Vorobiev, E., & Lebovka, N. (2008). Electrotechnologies for Extraction rom food plants and Biomaterials. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-79374-0>
- Wang, T. yang, Li, Q., & Bi, K. shun. (2017). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.004>
- Wang, W., Ma, X., Xu, Y., Cao, Y., Jiang, Z., Ding, T., ... Liu, D. (2015). Ultrasound-assisted heating extraction of pectin from grapefruit peel: Optimization and comparison with the conventional method. *Food Chemistry*, 178, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.080>
- Widmer, W., Zhou, W., & Grohmann, K. (2010). Pretreatment effects on orange processing waste for making ethanol by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*, 101(14), 5242–5249. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.038>
- Wikandari, R., Nguyen, H., Millati, R., Niklasson, C., & Taherzadeh, M. J. (2015). Improvement of biogas production from orange peel waste by leaching of limonene. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/494182>
- Wongkittipong, R., Prat, L., Damronglerd, S., & Gourdon, C. (2004). Solid-liquid extraction of andrographolide from plants - Experimental study, kinetic reaction and model. *Separation and Purification Technology*, 40(2), 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2004.02.002>
- Xu, Y., Zhang, L., Bailina, Y., Ge, Z., Ding, T., Ye, X., & Liu, D. (2014). Effects of ultrasound and/or heating on the extraction of pectin from grapefruit peel. *Journal of Food Engineering*, 126, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.11.004>
- Xun, L. (2015). Valorisation énergétique de la biomasse lignocellulosique par digestion anaérobie : prétraitement fongique aérobie. Thèse de Doctorat.
- Yu, X., Gouyo, T., Grimi, N., Bals, O., & Vorobiev, E. (2016). Ultrasound enhanced aqueous extraction from rapeseed green biomass for polyphenol and protein valorization. *Comptes*

- Rendus Chimie, 19(6), 766–777. <https://doi.org/10.1080/01496395.2016.1141957>
- Zheng, H., Hwang, I.-W., & Chung, S.-K. (2009). Enhancing polyphenol extraction from unripe apples by carbohydrate-hydrolyzing enzymes. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 10(12), 912–919. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0920186>
- Zill-e-huma, H. (2010). *Microwave Hydro-diffusion and gravity: a novel technique for antioxidants extraction*.
- Zill-e-Huma, Abert Vian, M., Maingonnat, J. F., & Chemat, F. (2009). Clean recovery of antioxidant flavonoids from onions: Optimising solvent free microwave extraction method. *Journal of Chromatography A*, 1216(45), 7700–7707. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.09.044>
- Zou, Z., Wanpeng, X., Yan, H., Chao, N., & Zhiqin, Z. (2016). Antioxidant activity of Citrus fruits. *Food Chemistry*, 196, 885–896. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.072>