

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Béjaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Alimentaires
Spécialité Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Optimisation des conditions d'extraction
des polyphénols à partir des déchets
(écorces et pépins) de la mandarine**

Présenté par :

M^{elle} BOUHEROUR Razika

Soutenu le : 30 Juin 2019

Devant le jury composé de :

Mme ADJEROUD Nawel
Mr BOUDRIES Hafid
Mr NABET Nacim
Mme BELKHIRI Wassila

MCB	Président
MCA	Encadreur
MCA	Examineur
Ing.Recherche	Co-promoteur

Année universitaire : 2018 / 2019

Remerciements

*Je voudrai dans un premier temps remercier, mon promoteur **Mr BOUDRIES Hafid** d'avoir accepté de m'encadrer, de m'avoir donné la chance de réaliser ce modeste travail, et surtout pour sa patience.*

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à ma Co-promotrice **Mme BELKHIRI Wassila** de m'avoir Co-encadré tout au long de ce travail, je la remercie pour ses conseils, sa compréhension et surtout pour ses qualités humaines et scientifiques. Un grand merci d'avoir mis tous les moyens du laboratoire à ma disposition pour me faciliter le travail, de m'avoir aidé dans la rédaction de ce document et surtout pour sa grande sympathie. Ce travail est pour moi l'occasion de vous témoigner ma profonde gratitude.*

*Je désire remercier Monsieur **BOUKHALFA Farid** qui m'a toujours réservé le meilleur accueil malgré ses obligations professionnelles. Vos compétences, vos conseils et votre sens du devoir m'ont énormément marqué. Veuillez trouver ici l'expression de ma respectueuse considération et ma profonde admiration de m'avoir encouragé et soutenu.*

***Mr BACHIR-BEY Mustapha** qui m'a aidé dans la réalisation du plan d'expérience.*

*Je tiens à remercier également madame **ADJEROUD Nawel**, d'avoir accepté d'être parmi le jury en faisant l'honneur de présider le jury et d'évaluer mon travail et aussi monsieur **NABET Nacim** qui nous a honoré d'accepter de siéger parmi notre jury pour examiner et évaluer ce modeste travail.*

*A **M^{lle} MOUHOUBI Khokha** ainsi qu'aux ingénieurs du laboratoire **3BS**.*

Enfin mes remerciements sont adressés plus particulièrement à ma famille et mes amis(es).

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à ma très chère famille qui m'a toujours soutenu tout au long de mon parcours.

A mes très chers parents

Vos prières et votre bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mon parcours. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner

A mes sœurs « Naima, Aida et Nabila » et leurs maris

A ma petite sœur « Zehira »

A mes frères « Bibouh et Akli »

A mes neveux (Ayemen, Nassim, Seddik et Fares) et à ma nièce Racha qui m'a encouragé et soutenu tout au long de ce master 2.

A ma nièce Lyna

A ma collègue et mon amie Fatima

A ma collègue et Co-promotrice Wassila

A tous ceux qui ont contribué de près et de loin à la réussite de ce modeste travail.

Liste des abréviations

Abréviations

AOAC

BBC G250

BBD

BS

BSA

CM

DA

DCPIP

DNS

DPPH

EAG

EAM

EAU

EFS

EP

ERO

FAO

ISO

M

MF

MS

MSR

P

PPT

R

R²

SD

USDA

Y_{PPT}

Y_{AA}

Ppm

Désignations

Association of Official Analytical Chemists

Bleu de coomassie

Box-Behnken Design

Base Sèche

Bovin Serum Albumin

Carré moyen

Défaut d'ajustement

2,6-Dichlorophenolindophenol

Acide Di-nitro 3,5-salicylique.

1,1-diphényle-2-picryl hydrazyl

Equivalent d'acide gallique

Extraction assistée par Micro-ondes

Extraction Assistée par Ultrasons

Extraction assistée par Fluide Supercritique

Erreur pure

Espèces Réactives d'Oxygène

Food and Agriculture Organization

International Organization for Standardization

Modèle de régression

Matière Fraiche

Matière sèche

Méthodologie Surface de Réponse

Probabilité

Polyphénols totaux

Résidus

Coefficient de détermination

Standard Deviation

United States Department of Agriculture

Rendement en polyphénols totaux

Rendement en activité antioxydante

Partie par million

Liste des tableaux

N° du tableau	Titre	Page
I	Classification botanique de la mandarine	3
II	Données de production mondiale d'agrumes	5
III	Composition chimique globale des écorces de mandarine	6
IV	Les niveaux (bas et haut) des facteurs choisis pour la construction du plan d'expérience	19
V	Combinaisons effectuées pour l'optimisation des conditions d'extraction	20
VI	Composition chimique de la poudre de déchets de mandarine	21
VII	Conditions optimales de l'extraction des PPT ainsi que l'AA obtenues dans l'étude préliminaire	29
VIII	Les valeurs expérimentales et prédites de l'optimisation des conditions d'extraction des PPT et l'AA par le plan BBD pour la poudre de mandarine	31
IX	Analyse de variance du modèle et du défaut d'ajustement pour les PPT	33
X	Analyse de variance du modèle et du défaut d'ajustement pour l'AA	34
XI	Paramètres du modèle de surfaces de réponses des PPT et l'AA de la poudre des déchets de mandarine	35
XII	Conditions et valeurs optimales pour l'extraction des PPT et l'AA de la poudre des déchets de mandarine par MSR	41
XIII	Résultats en PPT ainsi que l'AA de la poudre des déchets de mandarine obtenus dans l'étude préliminaire	Annexe VIII
IVX	Suite des résultats en PPT ainsi que l'AA de la poudre des déchets de mandarine obtenus dans l'étude préliminaire	Annexe IX

Liste des figures

N° de la figure	Titre	Page
01	Image représentative de l'anatomie de la mandarine	4
02	Génération des bulles de cavitation par l'action des ultrasons	9
03	Plan de Box- Behnken à trois variables	10
04	photo représentative du séchage des déchets de mandarine à l'étuve	11
05	photo représentative des échantillons séchés et broyés	12
06	photo représentative du Bain à ultrasons utilisé (BRANSON).	15
07	Figure représentative de la réduction du radical <i>DPPH</i> *	17
08	Effet du type de solvant sur l'efficacité d'extraction des PPT (A) et l'AA (B)	23
09	Effet de la concentration de l'acétone sur l'efficacité d'extraction PPT (A) et l'AA (B) des déchets de mandarine	25
10	Effet de la température sur l'extraction des PPT (A) et l'AA (B) des déchets de mandarine	26
11	Effet du temps sur l'extraction des PPT (A) et l'AA (B) des déchets de mandarine.	27-28
12	Effet du ratio (solide/liquide) sur l'extraction des PPT (A) et l'AA (B) des déchets de mandarine	29
13	Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prédites en PPT (A), et l'AA (B)	32
14	Représentation spatiale des modèles de surfaces de réponses de l'effet de la concentration du solvant et de la température d'extraction sur l'extraction des PPT (A) et l'AA (B) des déchets de mandarine	39
15	Représentation spatiale des modèles de surfaces de réponses de l'effet de la température et du temps d'extraction sur l'extraction de PPT (A) et l'AA (B) des déchets de mandarine.	39
16	Représentation spatiale des modèles de surfaces de réponses de l'effet de la concentration du solvant d'extraction et du temps sur l'extraction de PPT (A) et l'AA (B) des déchets de mandarine	40
17	Courbe d'étalonnage des composés phénoliques	Annexe I
18	Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique	Annexe II
19	Courbe d'étalonnage des caroténoïdes	Annexe III
20	Courbe d'étalonnage des sucres totaux	Annexe IV
21	Courbe d'étalonnage des sucres réducteurs	Annexe V
22	Courbe d'étalonnage des protéines	Annexe VI
23	Courbe d'étalonnage des flavonoïdes	Annexe VII



Table des

Matières

Table des matières

Dédicaces

Remerciements

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction

1

Synthèse bibliographique

I. Les agrumes	2
I.1. La mandarine	2
I.1.1. les variétés	2
I.1.2. Classification botanique de la mandarine	3
I.1.3. Description morphologique et physiologique de l'écorce de mandarine	3
I.1.3.1. Le péricarpe	3
I.1.3.2. Le mésocarpe (ou albédo)	3
I.1.3.3. L'endocarpe	3
I.1.4. Production mondiale d'agrumes	4
I.1.5. Production nationale des agrumes	5
I.1.6. Composition chimique des sous-produits d'agrumes	5
I.1.6.1. Eau	6
I.1.6.2. Glucides	6
I.1.6.3. Fibres alimentaires	6
I.1.6.4. Minéraux	6
I.1.6.5. Antioxydants	6
A. Polyphénols	7
B. Flavonoïdes	7
C. Caroténoïdes	7
D. Vitamine C	7
I.1.7. Valorisation des déchets industriels	8
II. Méthodes d'extraction	8
II.1. Définition de L'extraction assistée par ultrasons (EAU)	9
III. Optimisation d'extraction par le plan d'expérience	10

III.1. Plans d'expérience	10
III.1.1. Méthodologie de surface de réponse (MSR)	10
III.1.1.1. Plan Box-Behnken (BBD)	10
Matériel et méthode	
<hr/>	
I. Matériel végétal	11
II. Préparation de l'échantillon	11
II.1. Le séchage	11
II.2. Broyage et tamisage	12
III. Caractéristiques physico-chimiques des écorces de mandarine	12
III.1. Taux d'humidité	12
III.2. Taux de cendre	13
III.3. Sucres totaux	13
III.4. Sucres réducteurs	13
III.5. Teneur en protéines	14
III.6. Acide ascorbique	14
III.7. Caroténoïdes	15
IV. Optimisation d'extraction des composés phénoliques et activité antioxydante	15
IV.1. Procédure d'extraction	15
IV.2. Dosage des polyphénols totaux	16
IV.2.1. Flavonoïdes	16
IV.2.2. Mesure de l'activité antioxydante	17
IV.2.2.1. Test de Piégeage du radical DPPH	17
V. Etude préliminaire	18
V.1. Choix de la nature et la concentration du solvant d'extraction	18
V.2. Température d'extraction	18
V.3. Temps d'extraction	18
V.4. Le ration Solide/liquide	18
VI. Méthodologie de surface de réponse MSR	19
VI.1. Application du plan d'expérience	19
VII. Analyse statistique	20
Résultats et discussion	
<hr/>	

I. Caractéristiques physico- chimiques des écorces de mandarine	21
I.1. Humidité, protéines, sucres totaux, réducteurs et taux de cendre	21
I.2. Vitamine C	21
I.3. Flavonoïdes	21
I.4. Caroténoïdes	22
II. Optimisation d'extraction des composés phénoliques et activité antioxydante	22
II.1. Extraction assistée aux ultrasons (EAU)	22
II.2. Etude préliminaire	22
II.2.1. Effet du solvant d'extraction	23
II.2.2. Effet de la concentration en acétone.....	24
II.2.3. Effet de la température.....	26
II.2.4. Effet du temps d'extraction	27
II.2.5. Ratio solide/ liquide	28
II.2.6. Conditions optimales	29
III. La méthodologie de surface de réponse	30
III.1. Etude de l'optimisation	30
III.2. Application du plan d'expérience	31
III.2.1. Vérification du modèle	31
III.2.2. Analyse de la variance	33
A. Modèle globale et manque d'ajustement	33
B. Coefficient de détermination R^2	34
II.2.3. Effet des facteurs	34
A. Effet linéaire	36
B. Effet Quadratique	36
C. Effet d'interaction	37
III.2.4. Analyse du modèle mathématique	37
III.2.5. Représentation spatiale et analyse des modèles de surfaces de réponses	38
III.2.6. Détermination des conditions optimales	41
Conclusion	42
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	



Introduction

Introduction

Les déchets des fruits et légumes, tel les écorces d'agrumes sont des matrices hautement valorisables vue leur disponibilité et leur richesse en ingrédients nutritionnels et fonctionnels (**Bejar et al., 2011**).

Les agrumes occupent le plus grand secteur de la production de fruit au monde avec plus de 100 millions de tonnes produits chaque année (**Huang and Ho, 2010**). Cette importante production agrumicole engendre de grandes quantités de déchets qu'il est important de valoriser.

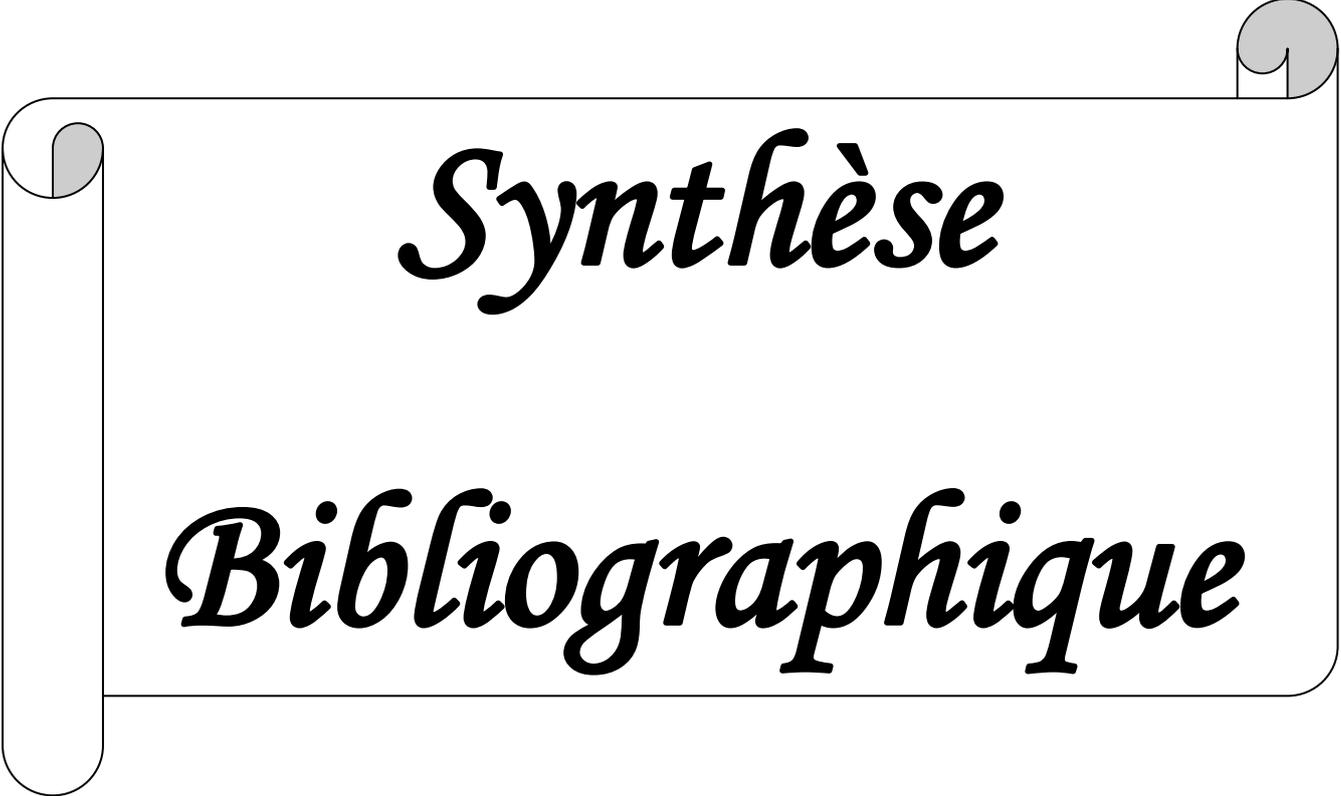
Les déchets de mandarine (*Citrus reticulata* blanco) sont une source riches de composés bioactifs, tels que les composés phénoliques (les flavonoïdes et les acides phénoliques), l'acide ascorbique, les caroténoïdes, les sucre réducteurs...etc (**Singanusong et al., 2015**).

L'exploitation des constituants bioactifs des sous produits alimentaires à partir de leur extraction de la matrice cellulaire, devrait être réalisée par des méthodes quantitatives, non destructives et rapides (**Dahmoune et al., 2013**).

L'extraction assistée par ultrasons (UAE) est l'une des méthodes qui attire de plus en plus l'attention des chercheurs en raison de son efficacité par rapport aux méthodes conventionnelles (**Khan et al., 2010**). Pour une application réussie de l'EAU, la puissance ultrasonore appliquée, la fréquence, le temps, la température d'extraction et l'interaction solvant-échantillon sont des variables à prendre considération (**Esclapez et al., 2011**).

L'optimisation du processus d'extraction est réalisée par méthodes empiriques ou statistiques. La méthodologie de surface de réponse (MSR) est un ensemble de techniques statistiques et mathématiques utiles au développement, à l'amélioration et à l'optimisation des processus. Le principal avantage de MSR est de réduire le nombre d'essais expérimentaux, nécessaire pour évaluer plusieurs variables et leurs interactions (**Chen et al., 2016**).

Dans le but de valoriser les sous produits de la mandarine commune (*Citrus reticulata* Blanco), l'objectif principal de la présente étude est l'optimisation des conditions d'extraction par ultrasons des composés phénolique et de l'activité antioxydante à partir des écorces de mandarine (*Citrus reticulata* Blanco) par application de la méthodologie de surface de réponse (MSR) en utilisant le plan d'expérience Box-Behnken (BBD) et en tenant compte de l'influence de plusieurs variables du processus, les principales étant la température, le temps d'extraction et notamment le solvant d'extraction.



Synthèse

Bibliographique

I- Les agrumes

Les agrumes appartiennent à la famille des Rutacées. On ne dénombre pas moins de 900 variétés à ce jour (**Ramful et al., 2011**).

Trois genres sont principalement cultivés dans le monde, *Poncirus*, *Fortunella* et *Citrus* (**M'Hiri, 2015**), c'est au sein de ce dernier que se rencontrent les principales espèces cultivées: les oranges (*Citrus sinensis*); les mandarines (*Citrus reticulata*); les clémentines (*Citrus clementina*); les citronniers (*Citrus limon*); et les pomelos (*Citrus paradisi*) (**Hellal, 2011**).

I.1. La mandarine

Le *Citrus reticulata* blanco communément connu sous le nom de « mandarine » (**Khan et al., 2010**) est largement cultivé dans les régions subtropicales, il est beaucoup plus résistant au froid que l'orange douce et l'arbre est plus tolérant à la sécheresse (**Lim, 2012**).

La mandarine commune (*Citrus reticulata* blanco) est parfois considérée localement représentative, qu'elle n'a pas de nom particulier : on l'appelle « la mandarine » comme s'il n'en existait pas d'autre variété. Dans le Bassin méditerranéen lorsqu'il est question de mandarine sans autre précision, il s'agit toujours de la mandarine commune. Divers appellations peuvent être trouvées remplaçant le mot commune dans les pays méditerranéen notamment en Algérie : de Bougie, de Boufarik, de Blidah et d'Algérie (**Chapot, 1962**).

Le fruit de la mandarine Commune possède en général un parfum unique, très marqué et très agréable, ce qui l'a fait grandement apprécier depuis longtemps (**Chapot, 1962**).

I.1.1. Les variétés

Quatre variétés de mandarines sont retrouvés, en plus de la mandarine *Commune*, la mandarine *Carvalhal*, remarquable variété, assez précoce, cultivée au Portugal d'où elle a été introduite au Maroc et de là en Algérie; la mandarine *Sanguigno*, qui est en réalité une tangerine et non une mandarine sanguine, d'origine italienne ; la mandarine *Mandalina*, exclusivement cultivée au Liban, et qui est aussi une tangerine. Toutes les autres variétés sont d'introduction récente (*Satsumas*, *Dancy*, *King of Siam*) ou très récente (*Wilking*) (**Chapot, 1962**). Selon **BOUSBIA (2011a)** les variétés de mandarine sont : Mandarine (*Citrus reticulata* Blanco) (dont la mandarine commune « Ponkan », clémentine et la tangerine), satsumas (*Citrus unshin*), Mandarines méditerranéennes (*Citrus deliciosa*) et la Mandarine king (*Citrus nobilis*).

I.1.2. Classification botanique de la mandarine

La classification botanique de la mandarine est représentée dans le tableau ci-dessous :

Tableau N°I : Classification botanique de la mandarine (Hellal, 2011)

Désignation	
Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Sapindales</i>
Famille	<i>Rutaceae</i>
Genre	<i>Citrus</i>
Espèce	<i>Citrus reticulata</i> blanco

I.1.3. Description morphologique et physiologique de l'écorce de mandarine

Tous les fruits cultivés de citrus ont presque la même structure. La coupe transversale du fruit permet de distinguer les parties suivantes (**Figure 01**) :

1.3.1. Le péricarpe

Le péricarpe représente 8 à 10% du fruit, c'est une écorce rugueuse, résistante, de couleur vive (jaune à orange), plus connu sous le nom d'épicarpe (ou *flavédo*), qui recouvre le fruit et le protège des dommages (**Guimarães et al., 2010**).

1.3.2. Le mésocarpe (ou albédo)

Le mésocarpe appelé albédo est la couche intérieure, de structure spongieuse, blanchâtre, plus ou moins épaisse par rapport à la taille du fruit, elle peut constituer 12 à 30% du fruit. Elle est intimement associée à l'épicarpe avec lequel elle forme ce qu'il est convenu d'appeler les écorces ou peau d'agrumes (**Bampidis and Robinson, 2006; Dugrand-Judek, 2015; Guimarães et al., 2010**).

1.3.3. L'endocarpe

L'endocarpe est la partie comestible d'agrumes. Il est constitué d'une fine membrane qui tapisse les nombreuses loges carpellaires (**Ramful et al., 2010**). Constitué de la pulpe, est divisé en segments (carpelles) où se concentre le jus (avec ou sans pépins selon les variétés) et en une enveloppe radiale épaisse (endocarpe) (**BOUSBIA, 2011a**).

Cette partie, riche en sucres solubles, renferme des quantités significatives de vitamine C, de pectine, de fibre, de différents acides organiques et de sel de potassium, qui donne au fruit son acidité caractéristique (BOUSBIA, 2011a).

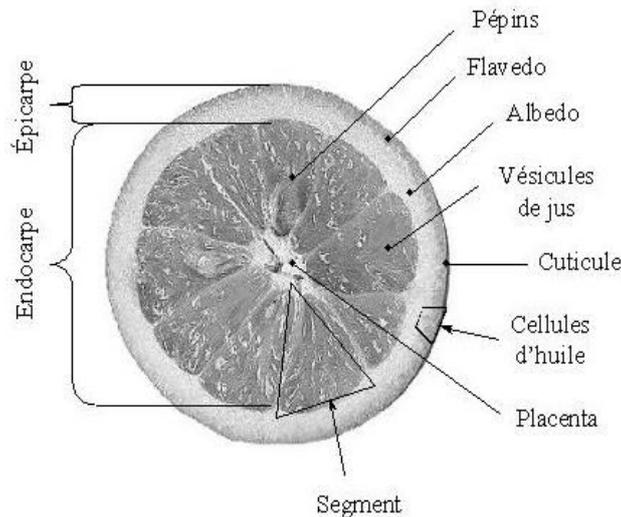


Figure N°01 : Image représentative de l'anatomie de la mandarine (Guimarães et al., 2010).

I.1.4. Production mondiale d'agrumes

Les agrumes sont des fruits ayant une valeur commerciale élevée sur le marché du frais et dans l'industrie alimentaire (Ledesma-Escobar and de Castro, 2014), ils représentent la première production fruitière mondiale avec plus de 135 millions de tonnes en 2013, répartis à plus de 71 millions pour les oranges, plus de 28 millions pour les mandarines, plus de 15 millions pour les citrons et limes et plus de 8 millions pour les pomelos (FAO : Food and Agriculture Organization, 2015) (Dugrand-Judek, 2015). Les premiers pays producteurs d'agrumes dans le monde sont représentés dans le **tableau II**.

Selon les données du Département Américain de l'Agriculture USDA (United States Department of Agriculture) la production mondiale d'agrumes s'élève à plus 90 MT pour la campagne 2016/2017. Durant la dernière décennie, la production de tangerines (mandarine) a augmenté de 5,2% passant de 19 MT en 2007/2008 à 29 MT en 2016/2017 (USDA, 2017).

Tableau N°II: Données de production mondiale d'agrumes (Dugrand-Judek, 2015)

Classement	Pays	Données	Date de l'information
1	Chine	33104744	2013
2	Brésil	19734725	2013
3	Etats-Unis	10133246	2013
4	Inde	10090000	2013
5	Mexique	7613105	2013
6	Espagne	6379100	2013
7	Egypte	4092339	2013
8	Nigeria	3800000	2013
9	Turquie	3681158	2013
10	Argentine	2814697	2013

I.1.5. Production nationale des agrumes

La production d'agrumes en Algérie est estimée à 517 milles tonnes. Cette dernière occupe la 19ème place mondiale et la 2ème dans l'Union Maghrébin Arabe. Cette production est répartie en plusieurs variétés d'agrumes dans laquelle l'orange représente 57%, la mandarine 30%, le pamplemousse 7%, le citron et la lime 6% (selon l'USDA, 2014) (M'Hiri, 2015).

La production nationale agrumicole avait dépassé les 14 millions de quintaux en 2018, contre 7 millions de quintaux en 2010, dont plus de 11 millions de quintaux d'oranges et 2,5 millions de quintaux de mandarine, et près de 800.000 quintaux de citrons. Sur un total de 32 wilayas productives d'agrumes, la wilaya de Blida vient en tête avec 4,1 millions de quintaux, suivie de Mostaganem avec 1,2 millions de quintaux, puis Tipasa avec 1,1 million de quintaux, la wilaya de Chlef étant considérée parmi les cinq wilayas pionnières dans ce domaine (<http://www.reporters.dz>).

I.1.6. Composition chimique des écorces de mandarine

La composition chimique des écorces d'agrumes (tableau III) est sujette à des variations sous l'influence de divers facteurs et notamment la variété. De plus, dans une même variété, la teneur en divers composés dépend des facteurs climatiques et environnementaux.

Tableau N°III : Composition chimique globale des déchets de mandarine (M'Hiri, 2015)

Désignation	Composition g/100 g de base sèche
Eau	60-75%
Lipides	2,97 g/100 g MS
Protéines	8,55 g/100 g MS
Minéraux	3,96 g/100 g MS
Glucides	18,27 g/100 g MS
Fibres	27 g/100 g MS
Caroténoïdes totaux	0,209 g/100 g MS
Phénol totaux	2,91 g/100 g MS
Vitamine C	0,280 g/100 g MS
Huiles essentielles (Limonène)	92,6%

I.1.6.1. Eau

Les écorces d'agrumes présentent des teneurs élevées en eau (soit 60% à 75% de base humide), de ce fait c'est un coproduit hautement périssable (M'Hiri, 2015).

I.1.6.2. Glucides

Les glucides des déchets d'agrumes sont les sucres solubles tels que le glucose, fructose et le saccharose, et les sucres insolubles tels que la cellulose, l'hémicellulose et les pectines (El Kantar et al., 2018).

I.1.6.3. Fibres

Les déchets d'agrumes sont riches en fibres et surtout en fibres hydrosolubles (pectines). En effet, les teneurs en pectine varient selon la variété (2,58-3,73% pour la mandarine) Plusieurs études ont porté sur l'extraction des fibres des écorces d'agrumes pour les utiliser dans la formulation des aliments diététiques. La pectine commerciale est extraite dans la plupart des agrumes (Wang et al., 2008). Ils contiennent aussi des fibres insolubles (l'hémicellulose, la cellulose et la lignine) (Fuentes-Zaragoza et al., 2010).

I.1.6.4. Minéraux

Les déchets d'agrumes sont riches en minéraux majeurs (Ca, Mg, K, Na) et quelques minéraux mineurs (Zn, Fer, Cu). Ces teneurs varient selon la variété considérée d'agrumes, les mandarines sont, essentiellement, riches en potassium (641-831 mg/100g BS) (Xu et al., 2008).

I.1.6.5. Antioxydants

Les antioxydants sont des composés naturels ou synthétiques, capables de piéger les radicaux libres et d'inhiber les processus d'oxydation (**Hayat et al., 2010b**).

Les agrumes sont une source importante de composés bioactifs, y compris des antioxydants comme les flavonoïdes de l'acide ascorbique, les caroténoïdes et les composés phénoliques (**Ghasemi et al., 2009; Goulas and Manganaris, 2012; Hegazy and Ibrahim, 2012**).

A. Polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires synthétisés dans les plantes en réponse aux stress écologiques et physiologiques. Ils possèdent un ou plusieurs cycles aromatiques avec un ou plusieurs groupes hydroxyles (**Missaoui, 2018**).

Les déchets de mandarine sont une source importante de composés phénoliques principalement les flavonoïdes et les acides phénoliques (**Hayat et al., 2010a; Hayat et al., 2010b**). La teneur en polyphénols totaux (PPT) de la mandarine est de l'ordre de 226,2 mg EAG/g BS (**Ghasemi et al., 2009**). Cette dernière est toujours nettement plus élevée dans les écorces que dans la pulpe (**Goulas and Manganaris, 2012**).

B. Flavonoïdes

Ce sont des composés phénoliques de faible poids moléculaire, responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (**Ghedira, 2005**). Les principaux groupes de flavonoïdes présents dans les écorces d'agrumes sont les flavanones, les flavones et les flavonols. L'héspéridine est le flavonoïde dominant dans la plus part des espèces d'agrumes (**Bousbia, 2011b**). Les teneurs en flavonoïdes de la peau étaient toujours plus élevées de 1,96 à 2,91 fois que celles de la pulpe avec une teneur en héspéridine de $63,065 \pm 0,55$ mg/g MS dans les écorces de mandarine (**Goulas and Manganaris, 2012**).

C. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des substances liposolubles jouant le rôle de pigments de couleurs jaune à rouge dans beaucoup de fruits et légumes dont le plus connu est le β -carotène (**Nève, 2002**).

Les agrumes sont une source importante de caroténoïdes, les teneurs en β -carotène des pelures de mandarine sont 4,5 fois plus élevé que celles de la pulpe (**Guimarães et al., 2010**), avec une teneur de 62,20 μ g/g (**Wang et al., 2008**).

D. Vitamine C

La vitamine C ou acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble, sensible à la chaleur, aux ultraviolets et à l'oxygène. C'est un antioxydant puissant capable de neutraliser

les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et susceptible de limiter la peroxydation lipidique (**Boubekri, 2014**).

Selon **de Moraes Barros et al. (2012)** et **Goulas and Manganaris (2012)** la teneur en vitamine C des écorces d'agrumes est de 0,109 à 1,150 g/100 g BS, sachant que l'écorce de mandarine contient la teneur la plus faible en vitamine C comparée à l'orange et au pamplemousse

I.1.7. Valorisation des déchets industriels

La consommation et l'industrie de transformation des agrumes génèrent de gigantesques masses de sous-produits tels que les écorces, les pulpes et les pépins. Ces derniers présentent une marge de 45 à 60 % du fruit entier et qui sont souvent rejetés dans la nature (**Lagha-Benamrouche et al., 2018; Li et al., 2006**).

Les déchets d'agrumes sont une matrice hautement valorisable vue sa richesse en ingrédients fonctionnels (huiles essentielles, fibres, caroténoïdes, vitamine C et composés phénoliques) ayant des applications très variées dans les industries agroalimentaires, cosmétique, nutraceutique et dans les industries de production de biocarburant et de matériaux biodégradables (**Celhay, 2013; Ledesma-Escobar and de Castro, 2014**). Egalement utilisés comme l'un des intrants de l'industrie pharmaceutique pour la préparation de médicaments, de savons, de parfums et autres produits cosmétiques.

Les écorces sont éventuellement riches en limonène, qui est employé dans la formulation de solvants industriels mais aussi comme solvant biologique. Ils peuvent être appliqués dans la production du plastique biodégradable (**M'Hiri, 2015**).

Leur richesse en sucres a permis aussi leur utilisation pour la production de biocarburants (éthanol), des biogaz. Une autre application intéressante des sous-produits d'agrumes dans les aliments du bétail (**Bampidis and Robinson, 2006**).

L'intérêt majeur des composés bioactifs est lié à leur activité pharmacologique, antibactérienne et surtout leur activité antioxydante (**Ghasemi et al., 2009**). Cette dernière est considérée comme responsable des propriétés «préventives» (**Celhay, 2013**).

II. Méthodes d'extraction

Outre les procédés classiques d'extraction par solvant couramment utilisés pour la récupération des composés phénoliques, des procédés non conventionnels, plus rapides et automatisés ont récemment été utilisés, tel l'extraction par fluide supercritique (EFS), extraction assistée par micro-ondes (EAM) et extraction assistée par ultrasons (EAU). Il a été

démontré que les micro-ondes et les ultrasons pourraient accélérer le processus d'extraction en améliorant l'extraction de composés bioactifs, en particulier de composés phénoliques (Dahmoune et al., 2013).

II.1. Définition de L'extraction assistée par ultrasons (EAU)

L'extraction des composés bioactifs par ultrasons (20-100 kHz) est une technique émergente qui offre beaucoup de reproductibilité en peu de temps, trois fois plus rapide qu'une extraction simple par solvant (Chemat and Khan, 2011). La matière première est immergée dans le solvant soit par contact direct (sonde) ou indirect (bain), et en même temps elle est soumise à l'action des ultrasons. Cette technique peut être utilisée pour l'extraction des composés aromatiques ou des essences de plantes, mais elle a surtout été développée pour l'extraction de certaines molécules ayant un intérêt thérapeutique, (Sališová et al., 1997).

Pendant la sonication, les ondes sonores génèrent des vibrations mécaniques dans un solide, un liquide ou un gaz. Les ondes sonores peuvent propager dans une matière et elles impliquent des cycles d'expansion (raréfaction) et de compression lors de la propagation dans le milieu (figure 2). L'expansion peut créer des bulles qui se forment, se développent et s'effondrent dans un liquide. Près d'une surface solide, l'effondrement de cavité est asymétrique et produit un jet de liquide à grande vitesse. Le jet liquide a un fort impact sur la surface solide (Bousbia, 2011b; Luque-Garcia and De Castro, 2003).

Les effets mécaniques des ultrasons induisent une plus grande pénétration du solvant dans les matériaux cellulaires et améliorent le transfert de masse. Dans le processus d'extraction Les ultrasons peuvent également perturber les parois cellulaires, facilitant la libération de leur contenu. Par conséquent, l'efficacité de rupture des cellules et du transfert de masse sont cités en tant que deux facteurs principaux menant aux bonnes performances de l'extraction avec la puissance ultrasonique (Mason et al., 1996).

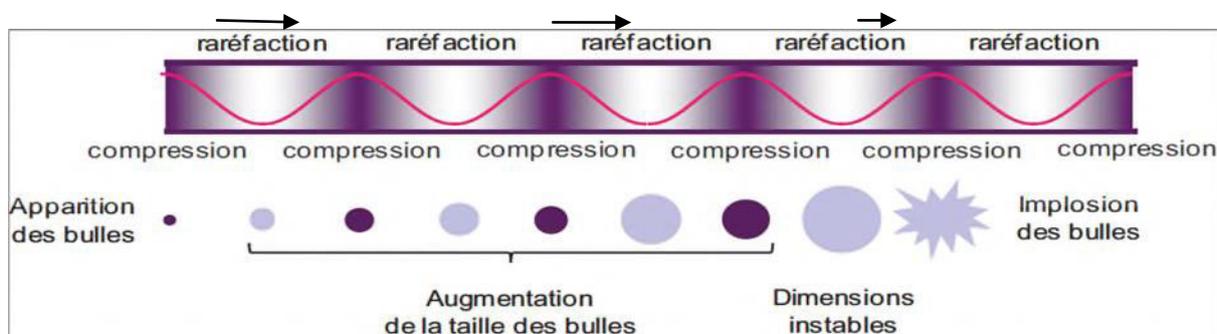


Figure N°02: Génération des bulles de cavitation par l'action des ultrason (Mason et al., 2003).

III. Optimisation d'extraction par le plan d'expérience

III.1. Plans d'expérience

Les plans d'expériences sont des techniques qui permettent de quantifier les effets de divers facteurs sur une réponse et de les optimiser dans des domaines expérimentaux bien déterminés. Une suite d'essais organisée consistant à manipuler les facteurs afin de décrire la méthode permettant d'obtenir la réponse optimale (Fadil et al., 2015).

III.1.1. Méthodologie de surface de réponse (MSR)

La méthodologie de surface de réponse (MSR) est un protocole statistique expérimental utilisé dans la modélisation mathématique. Cette méthode réduit les mesures, améliore la possibilité d'interprétation statistique et indique l'interaction entre les variables (Bachir et al., 2014).

Les trois types de plans de surface de réponse couramment utilisés sont les plans de Box-Behnken, les plans de Doehlert et les plans composites centrés. Dans le présent travail le Box-Behnken est le plan qui a été appliqué.

III.1.1.1. Plan Box-Behnken (BBD)

Le plan Box-Behnken est un type de plan de MSR, employé pour examiner le rapport entre une ou plusieurs variables de réponse et un ensemble de paramètres expérimentaux quantitatifs. L'application des conceptions BBD a été enregistrée dans l'optimisation des processus de technologie alimentaire, des études microbiologiques et des travaux du développement pharmaceutique de formulation (Ragonese et al., 2002).

Box et Behnken ont proposé des conceptions à trois niveaux pour adapter les surfaces de réponses. Celles-ci sont formées en combinant des factorielles avec des dessins de blocs incomplets. La **figure 03** illustre la conception à trois variables du BBD (Manohar et al., 2013). Les points expérimentaux du plan Box-Behnken sont représentés au milieu des arêtes de chacun des côtés d'un cube. C'est un plan qui peut comporter jusqu'à quinze essais (Goupy and Creighton, 2006).

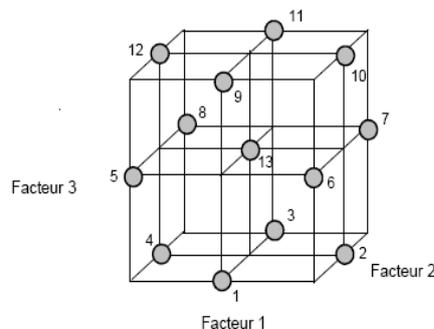
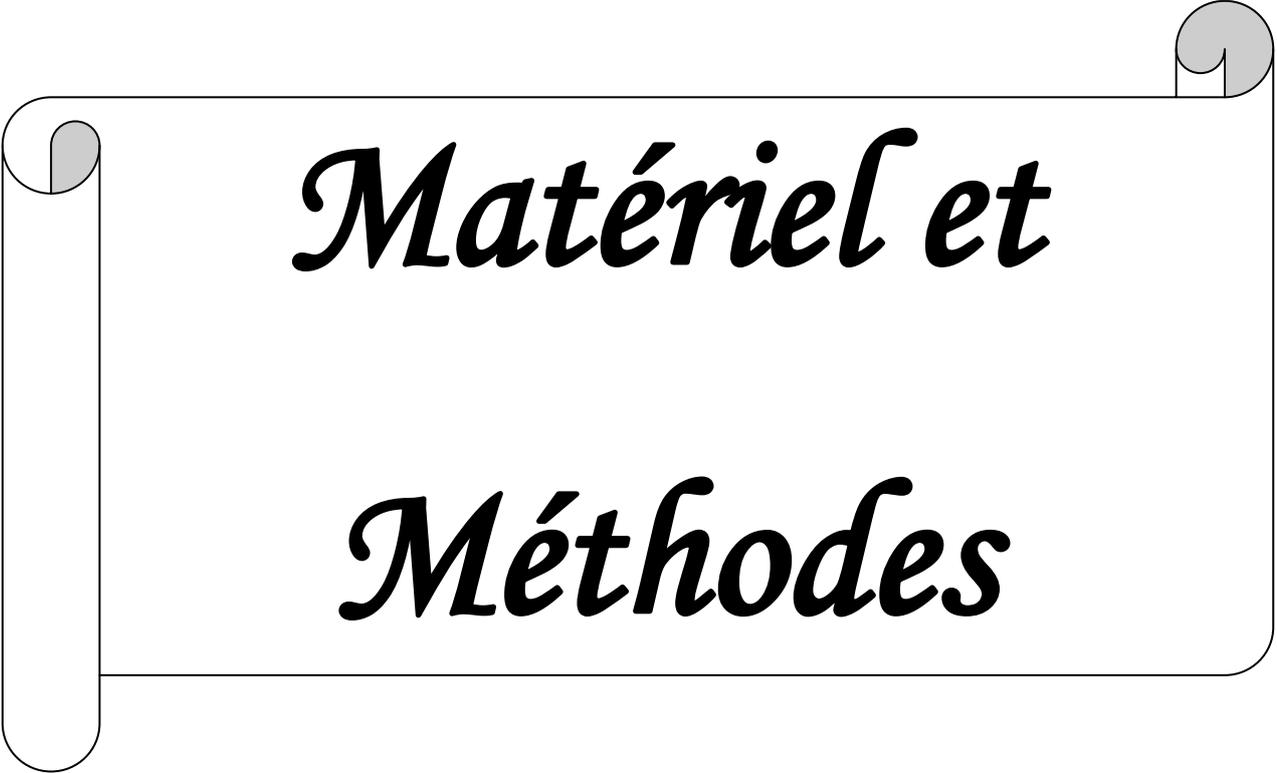


Figure N°03 : Plan de Box- Behnken à trois variables (Manohar et al., 2013)



Matériel et

Méthodes

I. Matériel végétal

La présente étude porte sur la valorisation des déchets (écorces, pépins) de mandarine *Citrus reticulata* blanco considérés comme sous-produits naturels.

Les fruits frais au stade de maturité (5 kg) ont été achetés au marché hebdomadaire de fruits et légumes de la wilaya de Bejaia, en mois de Mars 2019. Ces derniers ont été emballés et transportés au laboratoire dans des sacs hermétiquement fermés.

Les mandarines (Oued Ghir) ont été sélectionnées pour leur uniformité, leur couleur orange et leur poids moyen qui était de 120 ± 7 g.

Les mandarines fraîches ont fait l'objet de détermination du taux d'humidité, taux de cendre et de dosage de la vitamine C et caroténoïdes. Le reste de l'échantillon a été mis au séchage pour l'étude d'optimisation.

II. Préparation de l'échantillon

II.1. Le séchage

Les mandarines fraîchement récoltées ont été soigneusement lavées avec l'eau du robinet afin d'éliminer toutes les impuretés à la surface. Les écorces et les graines ont été retirés manuellement des fruits; afin d'extraire les pépins, les mandarines ont été découpées en deux pour faciliter leur l'extraction et les écorces ont été découpées en petits carrés de 1 cm^2 , par la suite les déchets (environ 1,4 kg) ont été mis à sécher dans une étuve ventilée (**figure 4**) à température 40°C (pour éviter toute sorte de dénaturation de leurs constituants) jusqu'à l'obtention d'un poids constant (36h). L'intérêt du séchage est d'éviter tout effet nocif dû à l'excès d'humidité qui favorise la fermentation microbienne des déchets et le développement des moisissures.



Figure N°04 : photo représentative du séchage des déchets de mandarine à l'étuve.

II.2. Broyage et tamisage

Le broyage des échantillons séchés (**figure 05**) a été réalisé à l'aide d'un broyeur (SEB, France) afin d'obtenir des poudres avec des granulométries plus au moins fines.

Le Tamisage des poudres obtenues a été réalisé à l'aide d'un tamiseur (**Retsch AS200**) de mailles de 500 µm de diamètre. La poudre ainsi obtenue a été conditionnée dans des flacons en verre opaques et hermétiques (pour protéger la poudre contre l'humidité et l'attaque par les moisissures), étiquetée, stockée à l'obscurité pour éviter l'oxydation de cette dernière et conservée à température ambiante dans un endroit sec et propre.



Figure N°05 : photo représentative des échantillons séchés et broyés

III. Caractéristiques physico-chimiques des écorces de mandarine

III.1. Taux d'humidité

La teneur en humidité des déchets (écorces et pépins) de mandarine a été déterminée selon le protocole de **Doymaz et al. (2004)**. Cette dernière a été mesurée par la dessiccation de 5 g de l'échantillon dans une étuve ventilée à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. L'humidité et la matière sèche ont été calculées selon les formules suivantes (**Taleb Née Bouderaa, 2015**).

$$\mathbf{H\% = \frac{M1 - M2}{M1} \times 100}$$

$$\mathbf{Matière\ sèche = 100 - H\%}$$

D'où:

H% : taux d'humidité en pourcentage ;

M1 : masse de l'échantillon avant séchage ;

M2 : masse de l'échantillon après séchage.

III.2. Taux de cendre

La teneur en cendres des déchets de mandarine a été déterminée selon la méthode officielle AOAC 972.15. Une quantité de 5 g de l'échantillon a été pesée dans des creusets en porcelaine préchauffés. Les creusets ont été ensuite placés dans un four à moufle à 550°C pendant 5 heures et ont été ensuite refroidis dans un dessiccateur, puis pesés (M'Hiri, 2015).

Le pourcentage de la teneur en cendres a été déterminé selon l'équation ci-dessous (M'Hiri, 2015).

$$\text{Teneur en cendre (\%)} = \frac{\text{la masse de cendre}}{\text{masse initiale de l'échantillon}} \times 100$$

III.3. Sucres totaux

Les sucres totaux ont été extraits suivant la procédure décrite par Kader et al. (1993), avec quelques modifications. Une prise d'essai de 5 g de poudre des déchets de mandarine a été mélangée avec 100 ml de l'éthanol 80% et l'ensemble est mis sous reflux réfrigérant pendant 10 minutes. Le surnageant a été récupéré par filtration à travers un papier filtre.

Le dosage des sucres totaux dans les extraits obtenus a été réalisé par la méthode de Dubois et al. (1956), en présence de l'acide sulfurique, les glucides sont déshydratés en dérivés de furfural qui se combinent facilement avec le phénol et donnent une coloration rose-saumon (le glucose fournit de l'hydroxy-méthyle-furfural).

Un volume de 0,5 ml du filtrat a été ajouté respectivement à 0,5 ml de phénol à 5% et 1,5 ml de l'acide sulfurique concentré, le mélange a été mis à l'abri de la lumière pendant 30 minutes à une température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 490 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un témoin.

La teneur en sucres totaux a été exprimée en g par 100 g de matière sèche et déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant le glucose (Annexe IV).

III.4. Sucres réducteurs

Le dosage des sucres réducteurs a été réalisé selon la méthode de DNS (acide di-nitro-3,5 salicylique) décrite par Miller (1959).

Une prise d'essai du surnageant récupéré pour le dosage des sucres totaux a été utilisé pour le dosage des sucres réducteurs.

Une coloration orangée due au réactif DNS apparaît proportionnellement à la teneur en sucres réducteurs. Un volume de 1 ml de réactif DNS (Annexe V) a été mélangé avec 1 ml de

l'échantillon à analyser. Après homogénéisation, le tout a été porté au bain marie à 100°C pendant 10 min. Les tubes ont été ensuite refroidis dans un bain à glace et 10 ml d'eau distillée ont été ajoutés pour arrêter la réaction. L'absorbance a été mesurée à 530 nm.

La teneur en sucres réducteurs dans la poudre exprimée en g pour 100 g de base sèche a été déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant le glucose (**Annexe V**).

III.5. Teneur en protéines

Le dosage des protéines a été réalisé selon la méthode de **Bradford (1976)**. Cette méthode colorimétrique permet de déterminer la concentration d'une solution protéique.

Une quantité de 1g de poudre a été dissoute dans 50 ml d'eau distillé puis agitée pendant 30 minutes et filtrée à travers un papier filtre.

Un volume de 1 ml du filtrat a été additionné de 3 ml de bleu de coomassie (**Annexe VI**), et l'absorbance a été mesurée à 595 nm (**Kruger, 2009; Mohammadi et al., 1989**).

La teneur en protéines a été déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec du BSA (Albumin Serum Bovin) dans les mêmes conditions opératoires (**Annexe VI**).

III.6. Acide ascorbique

Le dosage de l'acide ascorbique est basé sur la réaction d'oxydation de la vitamine C par le 2,6 dichloro-phénol-indophénol (DCPIP) en milieu acide. Le produit de réduction est de couleur rose. La présence de la vitamine C se traduit par le virage de la couleur bleu du DCPIP en rose pale (**Hughes, 1983**).

L'extraction de la vitamine C a été réalisée selon la méthodes décrite par **Klein and Perry (1982)**. Une quantité de 0,5 g des déchets (écorces et pépins) frais de la mandarine a été mélangée à 20 ml de l'acide oxalique (1%), avec une agitation pendant 30 min à l'obscurité. Après centrifugation 5000 tpm/10 min, un volume de 300 µl de surnageant a été mélangé avec 2,7 ml de DCPIP à 15 ppm. L'absorbance a été lue à 515 nm après 15 secondes.

Les résultats ont été exprimés en mg équivalent d'acide ascorbique /100 g de MF en se référant à une courbe d'étalonnage. (**Annexe II**).

III.7. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des molécules lipophiles leur extraction exige l'utilisation de deux phases une phase apolaire pour solubiliser les caroténoïdes et une phase polaire pour éliminer les molécules hydrophile.

Le dosage des caroténoïdes a été réalisé suivant la méthode de **Ellong et al. (2015)**. Un volume de 25 ml d'un mélange d'hexane, acétone, éthanol (50/25/25) ont été ajoutés à 1g d'échantillon ; le mélange a été ensuite agité pendant 30 min puis filtré à travers un papier filtre. La phase supérieure contenant les caroténoïdes a été récupérée, et son absorbance a été mesurée à 450 nm.

La teneur en caroténoïdes a été exprimée en mg de β -carotène/100g MF, en se référant à une courbe d'étalonnage (**Annexe III**).

IV. Optimisation d'extraction des composés phénoliques et activité antioxydante

IV.1. Procédure d'extraction

L'extraction des polyphénols à partir de la poudre des déchets (écorces et pépins) de mandarine a été réalisée par la méthode de bain à ultrasons (BRANSON, type 5510E-DTH) (**figure 06**) fonctionnant à une fréquence de 42 ± 6 kHz, une puissance maximale de 100 W et à température maximale de 70°C. Un volume de 20 ml de solvant a été ajouté à 1 g de la poudre. Le mélange a été filtré à travers un papier filtre et le surnageant récupéré a été utilisé pour les différents dosages.



Figure N° 06 : photo représentative du Bain à ultrasons utilisé (BRANSON).

Afin d'optimiser les paramètres d'extraction, les extraits obtenus ont fait l'objet de différents dosages en polyphénols totaux (PPT) et flavonoïdes. L'activité antioxydante (AA) a éventuellement été évaluée. Les résultats des différents dosages ont été déterminés à partir des équations de régression linéaires des courbes d'étalonnage qui sont représentées en annexe et exprimés en mg équivalent par 100 g de matière végétale sèche.

IV.2. Dosage des polyphénols totaux

La détermination des polyphénols totaux est basée sur la méthode utilisant le réactif Folin-Ciocalteu. Ce dernier est un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) qui est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) en présence de carbonate de sodium (**Boizot and Charpentier, 2006; Georgé et al., 2005; Lapornik et al., 2005**)).

L'intensité de la coloration produite est proportionnelle à la quantité de composés phénoliques présents dans l'extrait (**Georgé et al., 2005**).

Un volume 200 μ l de l'extrait, a été mélangé à 800 μ l du réactif de Folin Ciocalteu (1/10). Après 4 min d'incubation à température ambiante, 400 μ l de carbonate de sodium Na_2CO_3 (7,5 %), ont été additionnés au mélange. L'ensemble préalablement agité est incubé à l'abri de la lumière pendant 1 heure. L'absorbance a été mesurée à 760 nm (**Maisuthisakul et al., 2008; Saffidine, 2018; Singleton and Rossi, 1965**).

Les résultats sont exprimés en mg équivalents d'acide gallique par 100 g MS par rapport à une courbe d'étalonnage (**Annexe I**).

IV.2.1. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre en position 5, susceptible de donner en présence de chlorure d'aluminium un complexe jaunâtre par chélation de l'ion Al^{+3} . La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présente dans l'extrait (**Ribéreau-Gayon, 1968**).

La teneur en flavonoïde des extraits a été déterminée par la méthode décrite par **Djeridane et al. (2006)**. Un volume de 1 ml d'extrait a été additionné à 1 ml de chlorure d'aluminium $AlCl_3$ à 2%. Le mélange a été incubé pendant 15 min puis l'absorbance a été mesurée à 430 nm.

Les résultats ont été exprimés en mg équivalent de quercétine par 100 g de matière sèche en se référant à la courbe d'étalonnage (**Annexe VII**).

IV.2.2. Mesure de l'activité antioxydante

IV.2.2.1. Test de Piégeage du radical DPPH

Le principe de la méthode est basé sur la mesure du piégeage des radicaux libres DPPH[•] (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl de couleur violette) (Mansouri et al., 2005). En présence de molécules dites antioxydants (AH) donneur d'atome H, le DPPH[•] est transformé en sa forme réduite (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine (DPPH-H)) de couleur jaune et au radical (A[•]) (figure 07), ce qui conduit à une diminution de l'absorbance (Boumerfeg et al., 2018; Lakshmi et al., 2014).

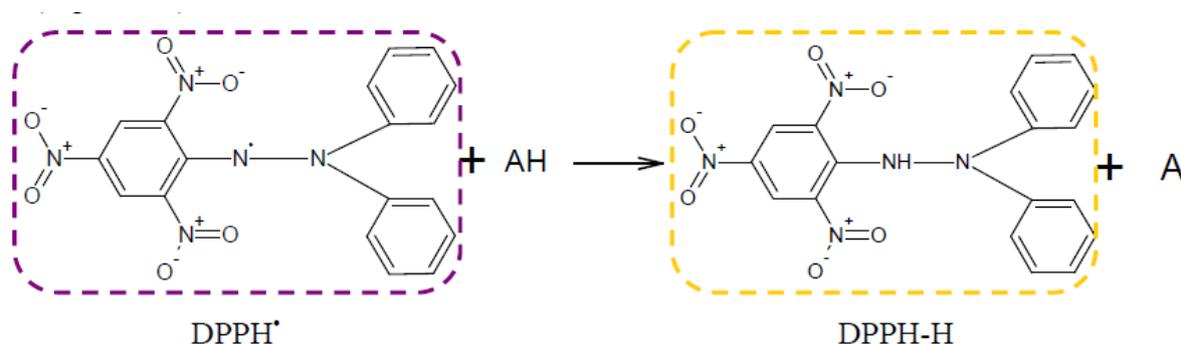


Figure N°07 : Figure représentative de la réduction du radical DPPH[•] (FEKIH).

L'activité de piégeage du radical DPPH[•] a été déterminée selon la méthode de Singh and Immanuel (2014), Un volume de 1,8 ml de solution de DPPH a été ajouté à 200 μl d'extrait puis le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la lecture de l'absorbance a été faite contre un blanc à 517 nm (Saffidine, 2018).

Le pouvoir anti-radicalaire de l'extrait a été exprimé en pourcentage d'inhibition du radical DPPH (% DPPH) par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{[A (\text{contrôle}) - A (\text{échantillon})]}{A (\text{contrôle})} \times 100$$

Avec :

A (Contrôle) : absorbance de la solution de DPPH sans l'échantillon;

A (Echantillon) : absorbance de l'extrait (Şahin and Şamlı, 2013).

V. Etude préliminaire

Une étude préliminaire a été effectuée pour déterminer les conditions optimales de l'UAE des PPT sur les déchets de la poudre de mandarine et évaluer l'AA de ces derniers.

V.1. Choix de la nature et la concentration du solvant d'extraction

L'extraction assistée par ultrasons a été réalisée en utilisant quatre types de solvant à des proportions 50% (v/v) : méthanol, éthanol, acétone et l'eau. Les paramètres de départ ont été fixés selon **Singanusong et al. (2015)**, le temps à 30 min, la température à 40°C, le ratio à 1 g/20 ml. La puissance et la pulsation ont été également fixées (100 W et 5 Sec). Le meilleur solvant a été choisi sur la base des résultats obtenus en teneur la plus élevée en PPT ainsi qu'en AA.

Après avoir choisi le meilleur solvant d'extraction, différentes extractions ont été effectuées à différentes concentrations (20, 40, 60, 80 et 100% (v/v)).

La meilleure concentration a été choisie en se basant aussi sur la teneur la plus élevée en PPT ainsi que l'AA.

V.2. Température d'extraction

L'impact de la température d'extraction 20°, 30°, 40°, 50°, 60° et 70°C a également été étudiée en utilisant le meilleur solvant à la meilleure concentration. La meilleure température d'extraction a été choisie selon la teneur la plus élevée en PPT ainsi que l'AA.

V.3. Temps d'extraction

La variation du temps d'extraction (10, 15, 20, 25 et 30 min) a été réalisée après avoir fixé les deux paramètres précédents (concentration en solvant et température d'extraction). Le meilleur temps d'extraction a été choisi sur la base de la valeur la plus élevée en PPT ainsi que l'AA.

V.4. Le ration Solide/liquide

La détermination du ratio (solide/liquide), a été réalisée en fixant le solide (1 g de la poudre) et en variant le solvant 10, 20, 30, 40 et 50 ml. Les autres paramètres déterminés précédemment (temps, température et concentration en solvant) ont été fixés. Le meilleur ratio d'extraction a été choisi sur la base de la valeur la plus élevée en PPT ainsi que l'AA.

VI. Méthodologie de surface de réponse (MSR)

L'optimisation de l'extraction des PPT et l'AA à partir des extraits de poudre des déchets (écorces et pépins) de mandarine a été réalisée par la méthodologie de surface de réponse en utilisant le logiciel JMP et le plan Box-Behnken (BBD).

Le but de l'étude est d'examiner l'interaction des paramètres d'extraction et d'obtenir les meilleures combinaisons possibles de ces derniers.

VI.1. Application du plan d'expérience

L'optimisation de la méthode d'extraction a été réalisée en employant le plan de Box-Behnken à trois niveaux, pour évaluer l'effet combiné de trois variables indépendantes : la température, concentration du solvant et le temps d'extraction désignés par X_1 , X_2 , X_3 respectivement.

L'étude préliminaire préalablement effectuée, a permis de déterminer les niveaux bas et haut pour les variables influençant l'expérimentation. Ces derniers sont illustrés dans le **tableau IV**.

Tableau IV: Les niveaux (bas et haut) des facteurs choisis pour la construction du plan d'expérience

Variables indépendantes	Niveau des facteurs		
	-1	0	+1
X_1 : Température (°C)	30	50	70
X_2 : Acétone (%)	10	50	90
X_3 : Temps (min)	5	20	35

Les différentes combinaisons effectuées pour l'optimisation des conditions d'extraction sont obtenues dans le **tableau V**

Tableau V : Combinaisons effectuées pour l'optimisation des conditions d'extraction

Essai N°	Configuration	Température	Concentration du solvant	Temps
1	--0	30	10	20
2	-+0	30	90	20
3	+--0	70	10	20
4	0	70	90	20
5	0--	50	10	5
6	0-+	50	10	35
7	0+-	50	90	5
8	0++	50	90	35
9	-0-	30	50	5
10	+0-	70	50	5
11	-0+	30	50	35
12	+0+	70	50	35
13	0	50	50	20
14	0	50	50	20
15	0	50	50	20

VII. Analyse statistique

Une analyse descriptive des résultats obtenus en triplicata pour chaque paramètre analysé ont été réalisées à l'aide du logiciel Microsoft Office Excel 2007, afin de déterminer les moyennes et les écarts types (moyenne \pm SD).

Une analyse de la variance (ANOVA-LSD) a éventuellement été appliquée à l'aide du logiciel STATISTICA 5.5, afin de mettre en évidence les différences significatives entre les résultats pour chaque paramètre. Le degré de signification des données est pris à la probabilité $p < 0,05$.

Un logiciel JMP (Version 7.0, SAS) a été utilisé pour construire le plan d'expérience de (BBD) pour l'analyse de tous les résultats.



Résultats et

Discussion

I- Caractéristiques physico- chimiques des déchets de mandarine

Les résultats de l'étude des caractéristiques physico-chimiques de la poudre des déchets de la mandarine commune sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau VI : Composition chimique de la poudre de déchets de mandarine

Les paramètres physico-chimiques	Les teneurs obtenues
Taux d'humidité (%)	76,4
Taux de matière sèche (%)	23,6
Taux de cendre (%)	3,86
Teneur en sucre totaux)	21,82 g/100 g MS
Teneur en sucre réducteur	18,14 g/100 g MS
Taux de protéines	7,21 g/100 g
Teneur en vitamine C	37,98 mg/100 g MF
Teneur en caroténoïdes	254,42±2,18 mg équivalent de β -Carotène/100g MS
Teneur en flavonoïdes	677,44 ± 17,74 mg équivalent de quercétine/100 g MS

I.1. Humidité, protéines, sucres totaux, réducteurs et taux de cendre

Les déchets (écorces et pépins) de mandarine présentent une teneur élevée en eau (76,4% Base humide). Selon **de Moraes Barros et al. (2012)** la teneur en humidité des écorces du *ponkan* (variété de mandarine) est de 77,1% et selon **Bejar et al. (2011)** les écorces d'agrumes contiennent une teneur élevée en eau comprise entre (60 à 75%), de ce fait les résultats enregistrés dans la présente études sont en accords avec ces derniers.

Les teneurs en protéine, sucres totaux et sucres réducteurs et les cendre enregistrées sont de 7,21, 21,82, 18,14 et 3,86 g/100 MS respectivement. Ces résultats sont dans la fourchette trouvé par **Bejar et al. (2011)** selon lesquels les déchets d'agrumes contiennent une teneur en protéine comprise entre (1,79 à 9,06 g/100g MS), en sucres solubles (6,52 à 47,81 g/100 MS) et un taux de cendre variant de 2,52 à 10,03 g/100 g de BS.

I.2. Vitamine C

La teneur en vitamine C présente dans l'échantillon analysé était de 37,98 mg d'équivalent d'acide ascorbique/100g MF. Ce résultat se rapproches de celui enregistré par **de Moraes Barros et al. (2012)** qui ont noté une teneur de 47,6 mg d'équivalent d'acide

ascorbique/100 g MF à partir des écorces de mandarine de la variété Ponkan. Cette différence peut être expliquée par l'effet variétal.

I.3. Flavonoïdes

Concernant les flavonoïdes une teneur de 677,44 mg équivalent de quercétine/100 g MS a été notée. Ce résultat est en accord avec celui de **Ramful et al. (2010)** qui ont indiqué que les flavonoïdes des déchets de mandarine renferme une teneur supérieure à 360 mg équivalent de quercétine /100 g MS.

Selon **Singanusong et al. (2015)** l'héspéridine est le flavonoïde majoritairement retrouvé dans l'écorce de mandarine extraite par EAU (600-3200 mg équivalent de quercétine/100 g de MS) de ce fait nos résultats sont aussi en accord avec ses derniers.

I.4. Caroténoïdes

La valeur enregistrée en caroténoïdes à partir de l'échantillon des déchets de mandarine analysé est de 245,42 mg équivalent de β -carotène /100 g BS.

Selon **Wang et al. (2008)** les écorces de Ponkan (*C. reticulata Blanco*) renferment la teneur la plus importante en caroténoïdes (204 \pm 3,6 mg équivalent de β -carotène /100 g BS), toutefois l'échantillon des déchets de mandarine que nous avons analysé a révélé une teneur légèrement plus élevée à cette dernière que nous pourrions expliquer par la différence variétale ainsi que les conditions climatiques (**Li et al., 2006**).

II. Optimisation d'extraction des composés phénoliques et activité antioxydante

II.1. Extraction assistée aux ultrasons (EAU)

Dans le présent travail la méthode d'extraction assistée par ultrasons a été utilisée pour optimiser les conditions d'extraction des PPT ainsi que l'AA des déchets (écorces et pépins) de la mandarine.

Quatre paramètres ont été variés dont la concentration du solvant, le temps, la température ainsi que le ratio (solide/liquide).

II.2. Etude préliminaire

Le choix du solvant d'extraction a été le premier paramètre étudié (eau, éthanol 50%, méthanol 50% et l'acétone 50%), suivi par le choix de la concentration en solvant (20, 40, 60, 80 et 100%), de la température (20°, 30°, 40°, 50°, 60° et 70°C), du temps (10, 15, 20, 25, 30 min) et du ratio (1/10, 1/20, 1/30, 1/40 et 1/50 ml v/v). Les résultats sont représentés en mg EAG/100 g MS pour les PPT et en pourcentage d'inhibition du radical DPPH' pour l'AA. (**Annexe VIII**) et (**Annexe IX**).

II.2.1. Effet du solvant d'extraction

Les figures 8A et 8B regroupent les résultats obtenus de l'étude de l'effet des différents solvants sur l'extraction des PPT et sur l'AA.

D'après les résultats enregistrés le type de solvant a une influence significative ($p < 0.05$) sur le taux d'extraction des PPT (figure 8A) ainsi que sur l'AA (figure 8B).

L'acétone 50% a permis l'extraction du taux le plus élevé en PPT (826,55 mg EAG/100 g MS) avec le pourcentage d'inhibition du radical DPPH' le plus important (86,31%), suivie du méthanol (781,25 mg EAG/100 g MS ; 83,46% respectivement), l'éthanol (755,38 mg EAG/100 g MS ; 83,34% respectivement) et de l'eau (549,46 mg EAG/100 g MS ; 62,41% respectivement).

Lors de l'application des ultrasons, la capacité d'extraire des PPT avec l'acétone s'accroît car ce dernier peut facilement être diffusé dans la matrice de la plante. De plus la cavitation acoustique se produit plus facilement dans le solvant d'extraction à faible viscosité vu que l'énergie ultrasonore dépasse plus facilement les forces intermoléculaires du liquide. Cependant, l'acétone a une pression de vapeur élevée (229,52 mmHg), ce qui entraîne moins de violence et d'intensité d'effondrement des bulles (Hemwimol et al., 2006)

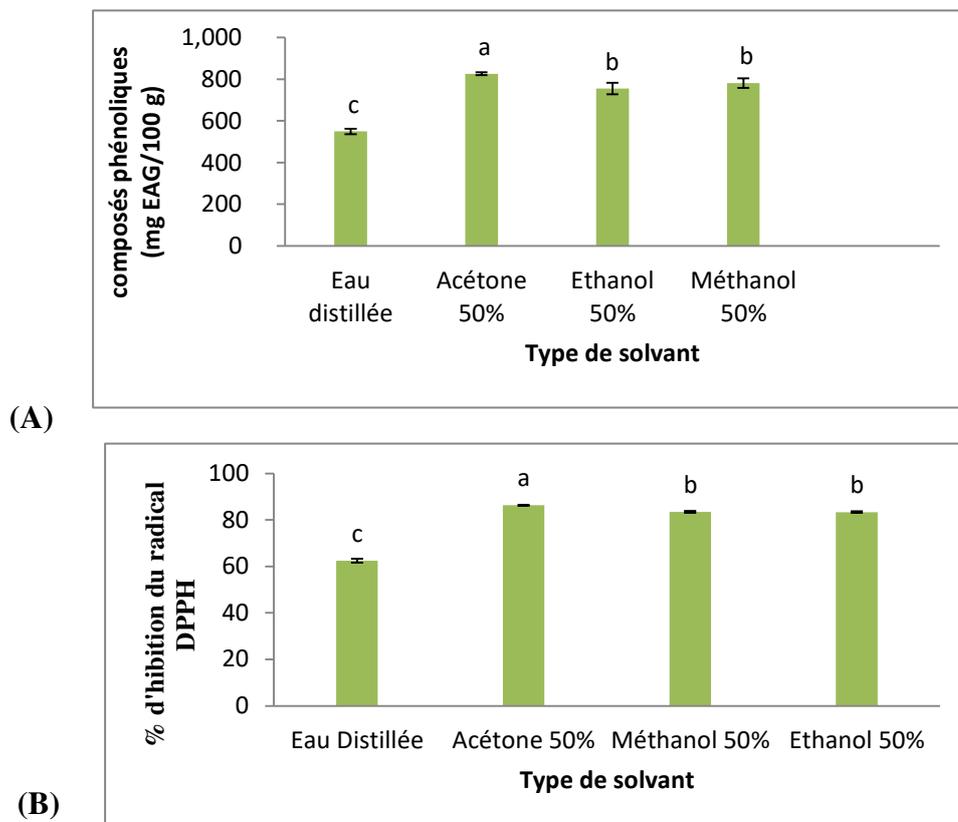


Figure N°08: Effet du type de solvant sur l'efficacité d'extraction des PPT (A) et l'AA (B) sur de la poudre des déchets de mandarine.

Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0,05$) avec $c < b < a$.

Plusieurs travaux ont montré l'acétone comme solvant qui a permis une meilleure extraction en composés phénoliques à partir de différents agrumes et plantes.

Les résultats de l'EAU des PPT à partir de pelures de mandarine (*Citrus reticulata* Blanco cv. *Sainampueng*) et de citron vert (*Citrus aurantifolia*) obtenus par **Singanusong et al. (2015)**, ont révélé l'acétone comme solvant ayant donné un meilleur rendement en composés phénoliques totaux et en flavonoïdes, suivi du méthanol et l'éthanol. La teneur en PPT enregistrée pour la mandarine est de 3083,61mg EAG/100 g MS. La différence notée entre nos résultats et ceux obtenus par ces auteurs peut être expliquée par l'effet variétal.

L'acétone 60% est le meilleur solvant d'extraction en PPT (6298 mg EAG/100 g MS) des feuilles du Henné par rapport à l'éthanol 60% et au méthanol 60% d'après **Uma et al. (2010)**.

Le choix du solvant s'effectue selon la nature des principes à dissoudre, ses caractéristiques économiques et son prix de revient, il doit être sélectif, posséder une grande capacité de dissolution, une température d'ébullition peu élevée, une faible viscosité et être, si possible, non toxique, inflammable, et non explosif (**Amor, 2008; Gérin, 2002**).

La solubilisation des composés dépend de leur affinité avec le solvant. Les différences de polarité entre les divers solvants permettent donc de cibler des groupes de molécules spécifiques (**Gérin, 2002**).

Les différentes efficacités d'extraction des solvants peuvent être attribuées à leurs différentes polarités et viscosités. Bien que les indices de polarité de l'acétone, du méthanol et de l'éthanol soient assez similaires (5,1, 5,1 et 5,2 respectivement), l'acétone a une viscosité inférieure (0,32 cP) à celle du méthanol (0,60 cP) et de l'éthanol (1,20 cP) (**Hemwimol et al., 2006**).

II.2.2. Effet de la concentration du solvant (acétone)

Après avoir déterminé le type du solvant approprié pour l'extraction des PPT, qui est l'acétone, différentes combinaisons acétone/eau ont été utilisées pour étudier l'effet de la concentration du solvant (20 ; 40 ; 60 ; 80 et 100% v/v).

Les résultats de l'étude de l'effet des différentes concentrations en acétone sur l'efficacité de l'extraction des PPT ainsi que l'activité antioxydante sont représentés dans les figures (**figure 9A et 9B**) ci-dessous.

Les résultats obtenus (**figure 9A et 9B**) indiquent clairement que les concentrations en acétone étudiées (20 ; 40 ; 60 ; 80 et 100% v/v) ont montré des différences significatives ($p < 0,05$) sur les teneurs en PPT et en AA.

Le meilleur rendement en PPT ainsi que la meilleure AA a été obtenu avec l'acétone 60% (809,77 mg EAG/100 g, 85,34% respectivement) alors que la faible teneur a été obtenue avec l'acétone 100% en PPT (481,86 mg EAG/100 g) et en AA avec un % DPPH (61,20%).

L'acétone 50% est le solvant choisi pour la suite des expériences de l'étude préliminaire par rapport à la teneur élevé en PPT (826,55±6.58 mg EAG/100 g) et l'importante AA (86,31±0.15%) enregistrés en comparaison à l'acétone 60%.

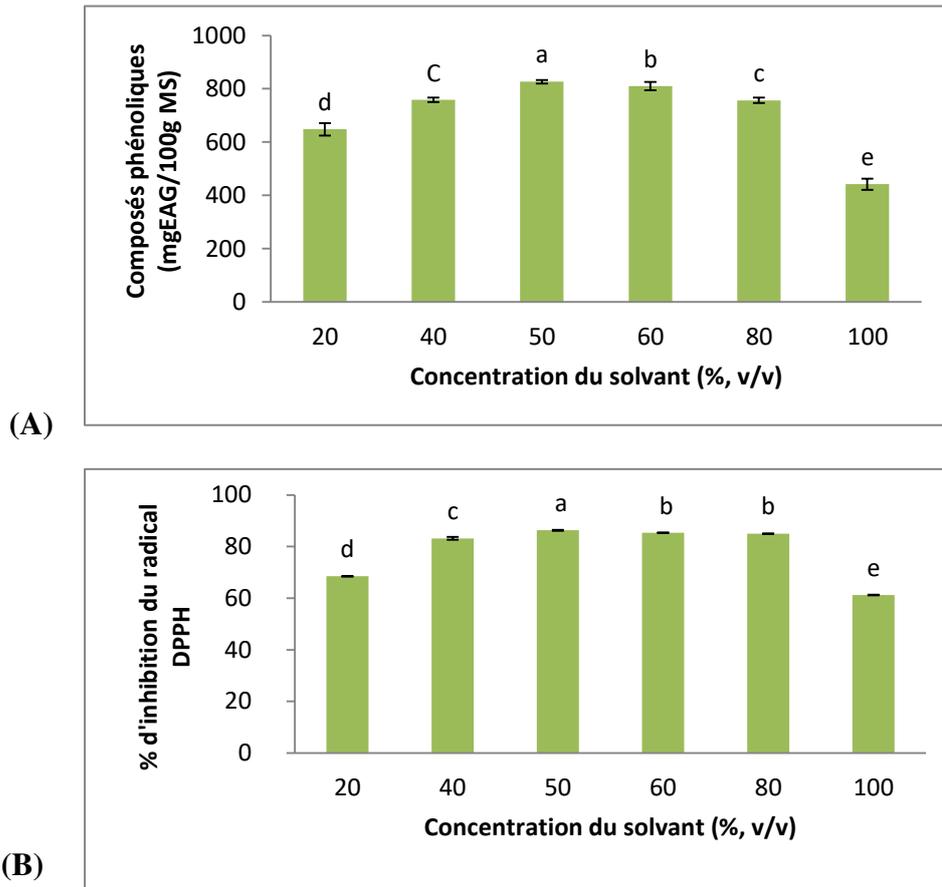


Figure N°09 : Effet de la concentration de l'acétone sur l'efficacité d'extraction des PPT (A) et l'AA (B) de la poudre des déchets de mandarine.

Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0,05$) avec $e < d < c < b < a$.

Uma et al. (2010) ont constaté que les teneurs en PPT extraites du henné augmentaient avec l'augmentation de la concentration en acétone de 20% (4725 mg EAG/100 g de MS) à 60% (6298,0 mg EAG/100 g MS), au delà de ces concentrations une diminution en PPT jusqu'à une teneur de 708,5 mg EAG/100g MS à 100% du solvant.

L'acétone 80% et le solvant permettant une excellente extraction de PPT à partir d'autres matrices tel a été démontré par **Chavan and Singhal (2013)** qui ont obtenus un meilleur rendement en PPT à partir des noix d'arec par EAU (362,59 mg EAG/g).

II.2.3. Effet de la température

La température a un effet significatif ($p < 0.05$) sur l'extraction des PPT ainsi que l'AA. De 20 à 60°C une augmentation progressive du taux des PPT (665,66 à 984,42 mg EAG/100 g) ainsi qu'une augmentation de l'AA (74,89 à 88,62%) a été observé. Après 70°C le taux des CPT (808,38 mg EAG/100g) et de l'AA (76,27%) diminue.

Les résultats sont illustrés dans les **figures 10A et 10B** ci-dessous.

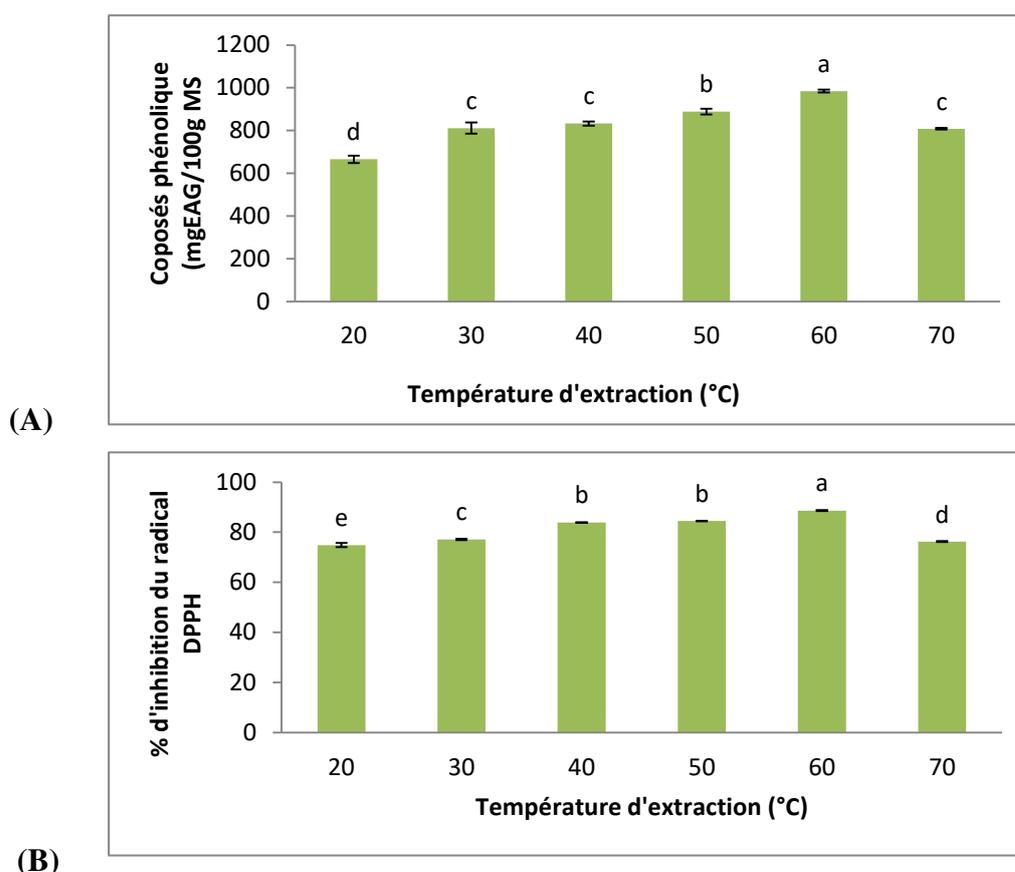


Figure N°10 : Effet de la température sur l'extraction des PPT **(A)** et l'AA **(B)** da la poudre des déchets de mandarine.

Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0,05$) avec $e < d < c < b < a$.

L'élévation de la température permet l'accroissement de la solubilité et de la diffusivité du soluté et la diminution de la viscosité. La limite supérieure de la température est imposée pour éviter les risques d'extraction des composés nuisibles et la dégradation thermique du soluté (**LEYBROS and FREMEAUX, 1990**). Plusieurs travaux ont montré l'effet positif de l'augmentation de la température sur l'extraction et la diffusivité des

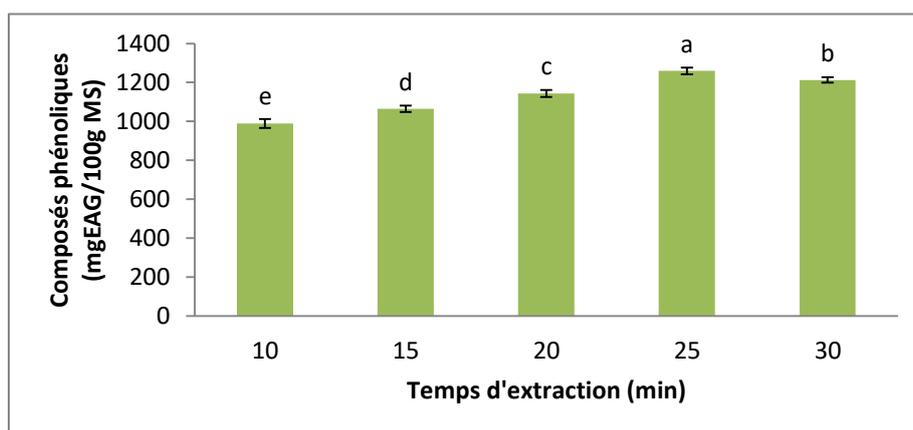
composés bioactifs. Ils ont montré que la diffusion de ces différents composés dépend énormément de la température et que l'influence de cette dernière est généralement caractérisée par la variation du coefficient de diffusion (Amor, 2008).

II.2.4. Effet du temps d'extraction

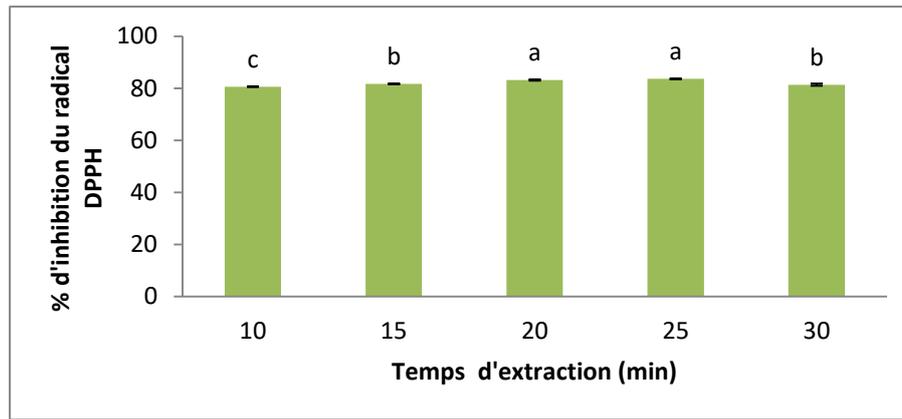
Le mécanisme d'EAU comprend deux étapes principales. La première concerne la dissolution des composants solubles sur la surface de la matrice végétale et la deuxième, implique le transfert maximal de masse de la substance dissoute à travers la matrice vers le solvant par diffusion et les processus osmotiques (Chavan and Singhal, 2013)

Les résultats obtenus (figure 11A et 11B) montrent clairement que l'augmentation du temps d'extraction fait augmenter le rendement en PPT ainsi que l'AA. De 10 à 25min on note une élévation de 988,93 à 1259,39 mg EAG/100 g MS en PTT, ainsi qu'une augmentation de l'AA (piégeage du radical DPPH^{*}) de 80,55% à 83,59%. Au delà de 25 min une diminution du taux de PPT (1212,95 mg EAG/100 g) et de l'AA (81,33%) a été observée.

Maran et al. (2017) ont pu extraire le maximum de PPT (552,64 mg EAG/100 g MS) des écorces du Ramboutan (*Nephelium lappaceum*) en 20 min dans un bain à ultrasons, de même pour Singanusong et al. (2015) qui ont pu extraire le maximum de PPT (3083,81 mg EAG/100 MS) ainsi que l'AA (94,65%) sur la poudre d'écorces de mandarine avec de l'acétone 80% en 30 min toujours dans un bain à ultrasons.



(A)



(B)

Figure N°11 : Effet du temps sur l'extraction des PPT (A) et l'AA (B) de la poudre des déchets de mandarine.

Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0,05$) avec $c < b < a$.

Les quantités de substances extraites sont en fonction du temps de séjour du matériel au sein du solvant (temps nécessaire à la pénétration du solvant à l'intérieur des vacuoles et dissolution du composé). Généralement, une élévation de la température traduisant l'agitation moléculaire permet de diminuer les temps de contact et ce, sans diminution notable du rendement (**Groubert, 1984**).

Un temps prolongé d'extraction peut augmenter la décomposition des composés bioactifs et diminuer de ce fait le rendement. Il est également évident qu'un temps beaucoup plus long soit une situation moins pratique du point de vue économique (**Chavan and Singhal, 2013**).

II.2.5. Ratio solide/ liquide

L'effet du ration (solide/liquide) sur l'extraction des PPT et l'AA est illustré dans les **figures 12 A et 12B**. Selon les résultats de l'étude, la teneur en PPT ainsi que l'AA augmente avec l'augmentation du volume du solvant d'extraction, allant de 20 ml pour atteindre son maximum (1162,22 mg EAG/100g) en PPT et (85,91%) en AA à 40 ml (avec un pas de 10ml), puis la teneur en PPT diminue à 50ml (1024,51 mg EAG/100 g) ainsi que l'AA (83,35%).

En général, un plus grand volume de solvant peut dissoudre des constituants efficacement, conduisant à une amélioration de l'extraction. Cependant du point de vu économique, utiliser une grande quantité de solvant n'est pas rentable, impliquant ainsi une consommation élevée d'énergie (**Yang et al., 2013**).

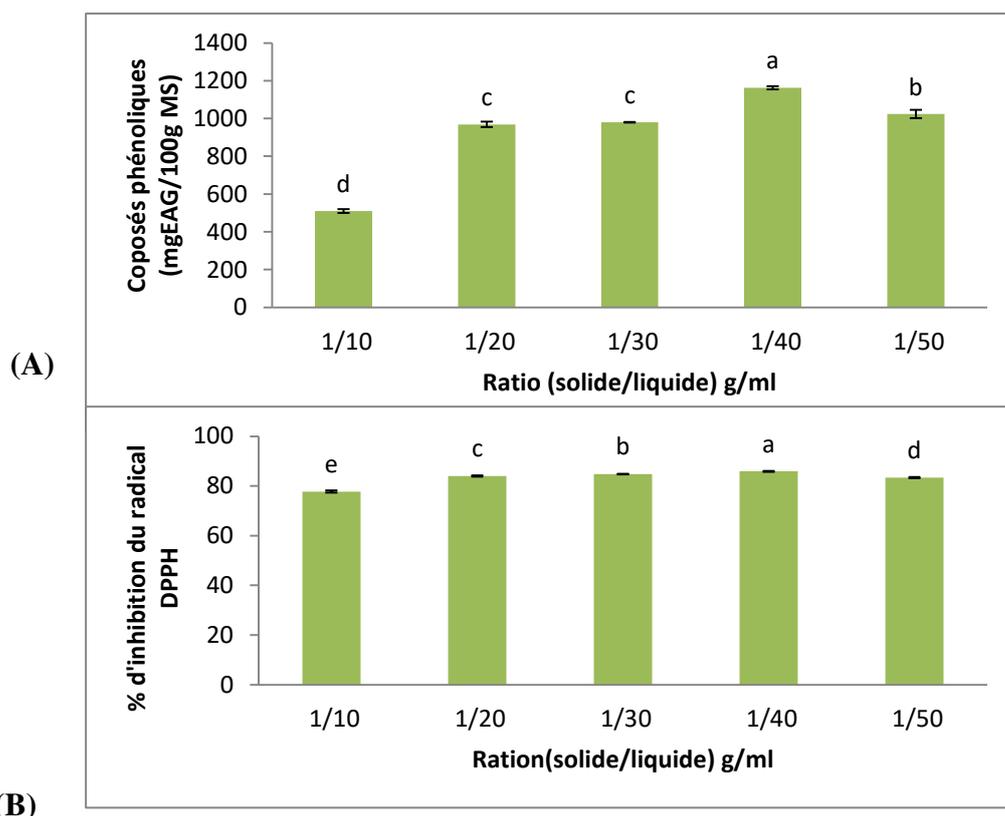


Figure N°12 : Effet du ratio (solide/liquide) sur l'extraction des PPT (A) et l'AA (B) de a poudre des déchets de mandarine

Les résultats qui portent des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0,05$) avec $e < d < c < b < a$.

II.2.6. Conditions optimales

Les conditions optimales de l'extraction des polyphénols totaux ainsi que l'AA par ultrasons à partir des déchets de mandarine sont indiquées dans le **tableau VII**.

Les résultats indiquent les optimums obtenus à partir de l'étude préliminaire des paramètres étudiés.

Tableau VII: Conditions optimales de l'extraction des PPT ainsi que l'AA obtenues dans l'étude préliminaire.

Les paramètres d'extraction	Les optimums obtenus	Valeurs des teneurs optimales	
		PPT (mg EAG/100 g MS)	AA (%DPPH)
Nature du solvant	Acétone		
Concentration du solvant	50%		
Température d'extraction	60°C	1259,39±17.34	83,59±0.21
Temps d'extraction	25 min		
Ration (solide/liquide)	1/40 (g/ml)		

III. La méthodologie de surface de réponse

La méthodologie de surface de réponse (MSR) est un protocole statistique expérimental utilisé dans la modélisation mathématique. Cette méthode réduit les mesures, améliore la possibilité d'interprétation statistique et indique l'interaction entre les variables (**Bachir et al., 2014**).

Dans cette étude, l'optimisation d'extraction d'antioxydants et l'optimisation de l'activité antioxydante à partir des déchets (écorces et pépins) de mandarine séchées a été réalisée par la MSR, qui permet d'étudier l'influence de chacun des trois paramètres (température, concentration en solvant et temps d'extraction) indépendamment et d'analyser l'interaction entre eux, elle permet également d'explorer les relations entre les variables avec les plans d'expériences et on obtient le maximum d'information avec le minimum d'expériences (**Goupy and Creighton, 2006**).

Après l'étude de l'influence des quatre paramètres sur l'extraction des PPT et l'AA (étude préliminaire) à partir des poudres des déchets de mandarine, trois paramètres ont montré une influence significative sur l'extraction des antioxydants et sur l'AA (T° , % solvant et temps).

Dans la MSR trois étapes ont été suivies; Réalisation du plan expérimental, modélisation de la réponse et représentations graphiques des résultats. Les plans utilisés sont des plans quadratiques, tel que les plans Box-Behnken. Ce dernier est utilisé pour l'optimisation d'extraction des antioxydants à partir des écores de mandarine.

III.1. Etude de l'optimisation

Pour le traitement des résultats de l'étude des conditions optimales d'extraction, le logiciel JMP a été utilisé et les courbes d'isoréponses ont été appliquées pour la recherche des zones de compromis entre les facteurs qui engendrent les réglages menant à la réponse souhaitée. La finalité de cet outil est d'obtenir des courbes de surface qui traduisent les variations des réponses (**Marti-mestres et al., 1998**). Après la détermination du modèle et la vérification de sa validité, les courbes d'isoréponses peuvent être tracées à l'intérieur du domaine expérimental. Ces courbes représentent des plans de surfaces de réponse, c'est-à-dire la représentation graphique des résultats (modèle estimé) afin d'en tirer des optimums. Ensuite, pour chercher le réglage optimal exact avec un certain pourcentage de compromis, la fonction «Désirabilité » a été utilisée, permettant de donner un réglage optimal exact variant entre 0 et 1 (**Fadil et al., 2015**).

En effet, la valeur 0 est attribuée lorsque les facteurs conduisent à une réponse inacceptable (non désirable) et celle de 1 lorsque la réponse représente la performance maximale désirée pour les facteurs considérés (**Fadil et al., 2015**).

III.2. Application du plan d'expérience

En se basant sur l'étude préliminaire, les gammes de chaque variable indépendante, la température (30-70°C), la concentration de solvant (acétone/eau 10-90% v/v) et le temps (5-35 min) ont été choisis pour la construction du plan d'expérience par le logiciel JMP et selon le modèle Box-Behnken pour déterminer l'effet de la réponse étudiée sur CPT et l'AA des poudres des déchets (écorces et pépins) de mandarine.

III.2.1. Vérification du modèle

Les conditions optimales pour l'extraction des CP et l'AA de la poudre des déchets de mandarine qui dépendent de la concentration en solvant, température et du temps d'extraction, ont été obtenues à l'aide des équations prédictives de MSR. Les valeurs expérimentales et prédites ont été comparées afin de déterminer la validité du modèle (**Tableau VIII**).

Tableau N°VIII : Valeurs expérimentales et prédites de l'optimisation des conditions d'extraction des PPT et l'AA par le plan BBD pour la poudre des déchets de mandarine

Essai N°	Paramètres			Composés phénoliques		Activité antioxydante	
	Température	Concentration du solvant	Temps	Mesurés	Prédits	Mesurée	Prédite
1	30 (-1)	10 (-1)	20 (0)	7,86	7,77	70,82	70,82
2	30 (-1)	90 (+1)	20 (0)	9,41	8,97	79,29	74,31
3	70 (+1)	10 (-1)	20 (0)	6,63	7,07	56,32	61,30
4	70 (+1)	90 (+1)	20 (0)	5,29	5,39	49,82	49,82
5	50 (0)	10 (-1)	5 (-1)	7,62	7,36	68,17	65,39
6	50 (0)	10 (-1)	35 (+1)	8,22	8,14	78,68	76,48
7	50 (0)	90 (+1)	5 (-1)	9,03	9,11	81,67	83,87
8	50 (0)	90 (+1)	35 (+1)	5,65	5,91	47,23	50,01
9	30 (-1)	50 (0)	5 (-1)	7,88	8,24	71,63	74,41
10	70 (+1)	50 (0)	5 (-1)	8,5	8,33	81,37	79,17
11	30 (-1)	50 (0)	35 (+1)	9,09	9,26	82,58	84,78
12	70 (+1)	50 (0)	35 (+1)	5,25	4,89	48,81	46,03
13	50 (0)	50 (0)	20 (0)	9,76	9,36	84,48	83,99
14	50 (0)	50 (0)	20 (0)	9,01	9,36	83,58	83,99
15	50 (0)	50 (0)	20(0)	9,31	9,36	83,92	83,99

Les résultats montrent que le taux d'extraction des PPT varie entre 5,25 à 9,76 mg EAG/g et ceux de l'AA varient entre 47,23 à 84,48%. Ces résultats sont très proches des

valeurs prédites avec 4,84 à 9,36 mg EAG/g pour les PPT et un pourcentage d'inhibition de radical DPPH' de 46,03 à 84,78% pour l'AA.

Chan et al. (2009) ont confirmé l'influence des paramètres temps, température et concentration du solvant sur le taux des CP extraits à partir des écorces du combava (*Citrus hystrix*) en utilisant la MSR. Selon Nagendra Prasad et al. (2011), d'autres facteurs peuvent avoir un effet sur l'extraction des PPT tel que le ratio solide/liquide, le pH et la granulométrie et d'après Amor (2008) la fréquence et la pression des ultrasons appliquées peuvent aussi réagir sur l'action des ultrasons et influencer ainsi l'effet de l'extraction.

Il ressort des résultats que les valeurs expérimentales et prédites sont fortement rapprochées. Le graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prédites (figure 13A et 13B) montre que les valeurs des modèles concordent avec les réponses mesurées, toutes les valeurs des PPT et de l'AA font partie de l'intervalle de confiance.

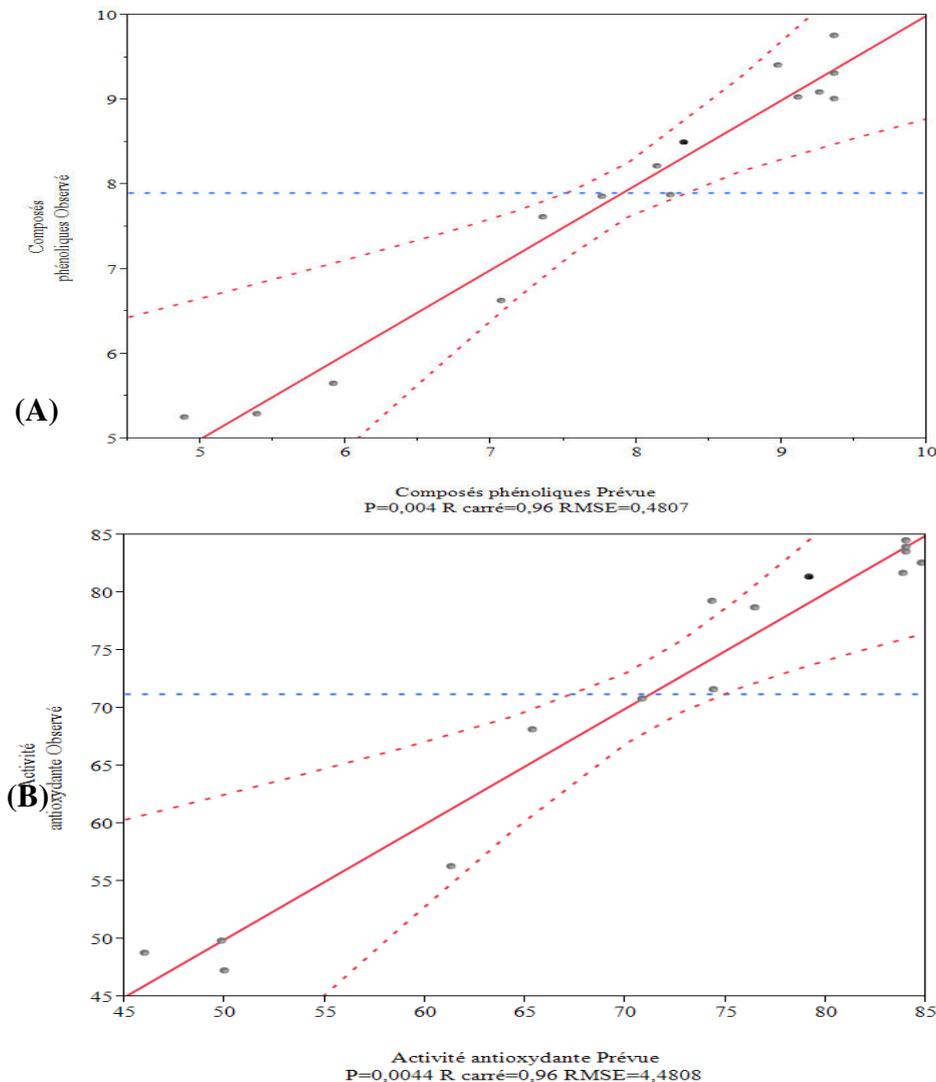


Figure N° 13 : Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prédites en PPT (A), et l'AA (B).

III.2.2. Analyse de la variance

Les résultats de l'analyse de la variance du modèle BBD sont illustrés dans les tableaux IX et X.

A. Modèle globale et manque d'ajustement

Le rapport (F) entre le carré moyen de la régression du modèle (M) et le carré moyen résiduel (R) a été utilisé afin de vérifier si le modèle était statistiquement significatif. La valeur du rapport **F (M/R)** explique de façon adéquate la variation des données autour de leur valeur moyenne, en plus, elle atteste l'effet significatif principal. Aussi, le rapport entre le carré moyen dû au défaut d'ajustement (DA) et le carré moyen dû à l'erreur pure (EP), $F(DA/EP)$ est utilisé pour évaluer l'ajustement du modèle par rapport aux observations. Un Rapport $F(DA/EP)$ élevé indique un défaut d'ajustement non significatif (**Ammar et al., 2010**).

L'analyse de la variance de la régression du modèle (**Tableau IX et X**), a montré que le modèle est très significatif pour les deux réponses ($P < 0,05$) et un manque d'ajustement non significatif ($P > 0,05$) par rapport à l'erreur pure, ce qui confirme que le modèle est satisfaisant. Dans un modèle, si la valeur de P du manque d'ajustement est significative ce modèle sera rejeté (**WANG and WANG, 2005**).

Tableau N°IX: Analyse de variance du modèle et du défaut d'ajustement pour les PPT.

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen (CM)	Rapport F (M/R)	Prob. > F
Modèle (M)	9	31,550518	3,50561	15,1735	0,0040*
Résidus (R)	5	1,155175	0,23103		
Défaut d'ajustement (DA)	3	0,8701750	0,290058	2,0355	0,3462
Erreur pure (EP)	2	0,2850000	0,142500		
R²	0,96468				
R² carré ajusté	0,901103				

Tableau N°X: Analyse de variance du modèle et du défaut d'ajustement pour l'AA

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F	Prob. > F
Modèle (M)	9	2618,8797	290,987	14,4932	0,0044*
Résidus (R)	5	100,3871	20,077		
Défaut d'ajustement (DA)	3	100,04779	33,3493	3.1350	0.2511
Erreur pure (EP)	2	21.27529	10.6376		
R ²	0,963083				
R ² _{ajusté}	0,896632				

B. Coefficient de détermination R²

L'analyse de la variance permet de calculer un paramètre statistique très utile qui est le coefficient de détermination R² (efficacité d'ajustement globale), ce dernier nous renseigne sur la qualité du modèle utilisé. Si cette grandeur se rapproche de 1, donc le modèle exprime une forte puissance d'explication, et s'il se rapproche de 0 il présente une faible puissance d'explication (Meziant et al., 2014).

Les résultats de l'analyse de la variance (tableau IX et X) pour l'effet des facteurs sur le taux de CP ainsi que l'AA indiquent que les deux modèles de réponse sont hautement significatifs ($p < 0,05$) avec un coefficient de détermination R²=0,96 ce qui signifie que 4% des variations ne sont pas expliquées par le modèle (cela pourrait s'expliquer par des erreurs de manipulation ou par la pureté du solvant utilisé) et une valeur de R²_{ajusté} de 0,90.

Le R²_{ajusté} est une valeur corrigée de R² après l'élimination des termes du modèle non significatifs. La présence de beaucoup de termes non significatifs inclus dans le modèle permet d'avoir un R²_{ajusté} plus petit que le R² (Chan et al., 2009), cependant selon les résultats obtenus (tableau IX) le R²_{ajusté} est proche de la valeur de R² ce qui affirme la significativité du modèle, et que les valeurs expérimentales sont fortement expliquées par les valeurs prédites.

III.2.3. Effet des facteurs

Les effets des trois facteurs étudiés (Température (X₁), concentration du solvant (X₂) et le temps d'extraction (X₃)) ainsi que leurs interactions sur les réponses d'extraction des PPT et de l'AA sont exprimés dans le tableau XI.

Tableau N°XI: Paramètres du modèle de surfaces de réponses des PPT et de l'AA de la poudre des déchets de mandarine

Terme	Estimation	Erreur standard	Rapport t	Prob.> t
Composé phénolique				
Constante	9,36	0,27751	33,73	<,0001*
Effet linéaire				
Température(30,70)	-1,07125	0,169939	-6,30	0,0015*
Concentration de solvant (10,90)	-0,11875	0,169939	-0,70	0,5158
Temps(5,35)	-0,6025	0,169939	-3,55	0,0165*
Effet d'interaction				
Température*Concentration de solvant	-0,7225	0,240331	-3,01	0,0299*
Température*Temps	-1,115	0,240331	-4,64	0,0056*
Concentration de solvant*Temps	-0,995	0,240331	-4,14	0,0090*
Effet quadratique				
Température*Température	-1,00625	0,250144	-4,02	0,0101*
Concentration Solvant*Concentration de solvant	-1,05625	0,250144	-4,22	0,0083*
Temps*Temps	-0,67375	0,250144	-2,69	0,0431*
Activité antioxydante				
Constante	83,993333	2,586982	32,47	<,0001*
Effet linéaire				
Température(30,70)	-8,5	1,584196	-5,37	0,0030*
Concentration de solvant(10,90)	-1,9975	1,584196	-1,26	0,2630
Temps(5,35)	-5,6925	1,584196	-3,59	0,0157*
Effet d'interaction				
Température*Concentration de solvant	-3,7425	2,240392	-1,67	0,1557
Température*Temps	-10,8775	2,240392	-4,86	0,0047*
Concentration de solvant*Temps	-11,2375	2,240392	-5,02	0,0040*
Effet quadratique				
Température*Température	-8,885417	2,331874	-3,81	0,0125*
Concentration de solvant*Concentration de solvant	-11,04542	2,331874	-4,74	0,0052*
Temps*Temps	-4,010417	2,331874	-1,72	0,1461

Les modèles mathématiques des surfaces de réponses des teneurs en PPT et l'AA se présentent sous forme de polynômes de second ordre. Ces modèles incluent les effets linéaires, d'interactions et les effets quadratiques des différents facteurs.

Les valeurs de P sont utilisées comme un outil pour vérifier la signification de chaque coefficient, et indiquent également l'intensité de l'interaction entre les paramètres. Plus la valeur de P est petite, plus grande est la signification du coefficient correspondant (**Chan et al., 2009**). La valeur de la probabilité des paramètres indique son influence, autrement dit la significativité du paramètre augmente avec la diminution de la probabilité, elle est dite significative si elle est inférieure à 0,05 ($P < 0.05$).

A. Effet linéaire

Le facteur qui influence significativement l'extraction des PPT et l'AA par ultrasons, est la température X_1 avec une probabilité de $P(0,0015)$ pour les PPT et $P(0,0030)$ pour l'AA, suivi par et le temps d'extraction (X_3) avec une probabilité $P(0,165)$ et $P(0,157)$ pour les deux réponses respectivement. Cependant l'impact est non significatif pour la concentration du solvant avec une valeur $P(0,5158$ et $0,2630)$ pour les deux réponses.

B. Effet Quadratique

Les résultats obtenus montrent l'existence des effets quadratiques influençant significativement la teneur en PPT extraite à partir de la poudre des écorces de mandarine ainsi que sur l'AA.

L'effet quadratique le plus prononcé pour les PPT ainsi que l'AA est représenté par l'effet de X_2X_2 (concentration solvant-concentration solvant), avec une probabilité de l'ordre de $P(0,0083)$ et $P(0,0052)$ respectivement, suivi par l'effet quadratique X_1X_1 (température-température) avec des probabilités de l'ordre de $P(0,0101)$ et $P(0,0125)$ pour les CP et l'AA respectivement et enfin l'effet quadratique X_3X_3 (temps-temps) avec une valeur de $P(0,0431)$ pour les CPT, par contre l'effets quadratiques X_3X_3 (temps – temps) est non significatif pour l'AA avec une probabilités $P(0,1461)$. Les effets quadratiques (X_1X_1), ($X_2 X_2$) et (X_3X_3) sont alors tous significatifs ($P < 0,05$) pour les PPT contrairement à l'AA qui sont significatifs uniquement pour (X_1X_1) et (X_2X_2).

La polarité du système eau-acétone varie en fonction de la concentration du solvant (acétone-eau), par conséquent les PPT extraits sont hautement dépendants de la polarité du solvant (**Uma et al., 2010**). L'augmentation de la concentration de l'acétone entraîne une diminution de sa polarité, ce qui a favorisé l'extraction de composants moins polaires. De plus, l'augmentation de la concentration en acétone favorise la dégradation de la membrane

cellulaire, ce qui améliore la perméabilité du solvant dans la matrice solide (Cheok et al., 2012).

C. Effet d'interaction

Les résultats de l'étude des interactions des trois variables (X_1 , X_2 , X_3) montrent que les effets d'interaction sont tous significatif pour les PPT (tableau XII).

Les deux interactions (X_1X_3) et (X_2X_3) sont significatives avec des valeurs de P(0,0056 et 0,0090) respectivement pour les PPT et P(0,0047 et 0,0040) pour l'AA. L'interaction (X_1X_2) est significative à une valeur de P(0,0299) pour les PPT, par contre cette dernière n'est pas significative pour l'AA avec une valeur de P(0,1557).

Chan et al. (2009) et Bachir et al. (2014) ont montré que les effets linéaires et quadratiques des trois paramètres (concentration du solvant, temps et température) sont significatifs sur l'extraction des PPT et l'AA, et que parmi les trois paramètres étudiés, seule la concentration du solvant influençait l'extraction les PPT des écorces de *Citrus hystrietx* et sur les figes noir fraîches.

II.3.2.4. Analyse du modèle mathématique

Dans l'absolu, le choix d'un plan d'expérience n'a pas de sens tant qu'il n'est pas subordonné au choix préalable d'un modèle mathématique. Le model mathématique postulé utilisé avec le plan de Box-Behnken pour trois facteurs est un model du second degré classique, volontairement simplifié par élimination des effets d'interactions jugés non significatifs dans l'analyse, ce qui permettra de manipuler plus facilement l'expression réduite tout en gardant une qualité d'ajustement quasiment similaire (Tinsson, 2010).

D'après les résultats de l'étude, les valeurs des coefficients significatifs et la fonction qui régit l'extraction des PPT ainsi l'AA à partir de la poudre des déchets (écorces et pépins) de mandarine étudiée, sont alors bien connues. Le model mathématique quadratique du plan Box-Behnken de la présente étude est représenté par les équations suivantes :

Pour les composés phénoliques

$$Y_{\text{PPT}} = 9,360 - 1,071 x_1 - 0,602 x_3 - 0,722 x_1x_2 - 1,115 x_1x_3 - 0,995 x_2x_3 - 1,006 x_1^2 - 1,056 x_2^2 - 0,673 x_3^2$$

Pour l'activité antioxydante

$$Y_{\text{AA}} = 83,993 - 8,5 x_1 - 5,692 x_3 - 10,877 x_1x_3 - 11,237 x_2x_3 - 8,885 x_1^2 - 11,045 x_2^2$$

Avec :

Y_{PPT} : rendement en polyphénols totaux (réponse)

Y_{AA} : rendement en activité antioxydante (réponse)

x_1 : température d'extraction

x_2 : concentration du solvant

x_3 : temps d'extraction

Il est bien connu que les conditions d'extraction et les caractéristiques de l'échantillon peuvent affectés la fiabilité et l'efficacité de l'extraction d'une manière significative.

L'extraction des PPT est une étape très importante qui exige certaines conditions permettant la maximisation de l'extraction avec le minimum de dégradation. L'application de l'EAU est d'un intérêt majeur du point de vue industriel dans la technologie de transformation des aliments, car elle facilite l'extraction des PPT à partir de matériaux végétaux, et augmente le rendement (**Garcia-Salas et al., 2010**).

III.2.5. Représentation spatiale et analyse des modèles de surfaces de réponses

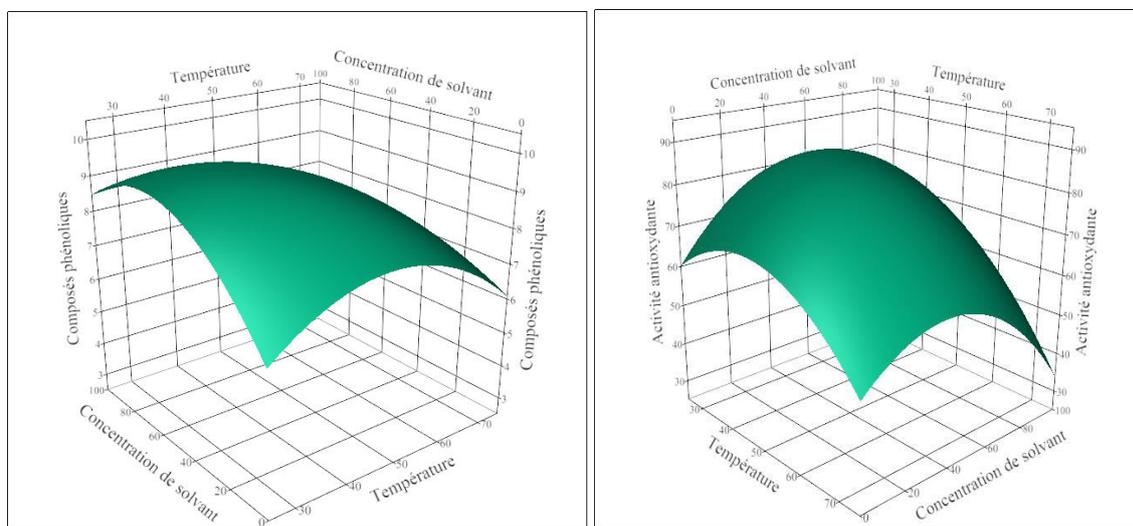
L'interaction des trois variables indépendantes température, concentration du solvant et le temps a été utilisée pour tracer les courbes de surface de réponse pour le PPT et l'AA en utilisant les équations tridimensionnelles (Y_{PPT} et Y_{AA}) comme illustré dans les figures ci-dessous.

Des représentations graphiques illustrant les effets des différents facteurs sont représentés dans les figures 14A, 14B, 15A et 15B. Dans chaque graphe, deux paramètres varient dans le domaine expérimental et le troisième est fixé à son niveau central (niveau 0).

Les **figures 14 et 15** représentent respectivement les présentations spatiales en trois dimensions des effets de la température et de la concentration du solvant ainsi que les effets de la température et du temps d'extraction. D'après la représentation graphique des résultats, l'effet quadratique de la température sur l'extraction des PPT et l'AA est bien illustré et l'effet d'interaction température, concentration du solvant a entraîné une augmentation de la teneur en PPT.

Le taux d'extraction des antioxydants augmente avec l'augmentation de la température pour atteindre le maximum d'extraction à une température de 40,47°C, au delà de cette température, la teneur en PPT diminue, ce qui pourrait être expliqué par la présence des substances thermolabiles dans les extraits (**Bachir et al., 2014**). Cela indique aussi que certains composés phénoliques ont été dégradés par la température élevées du processus de

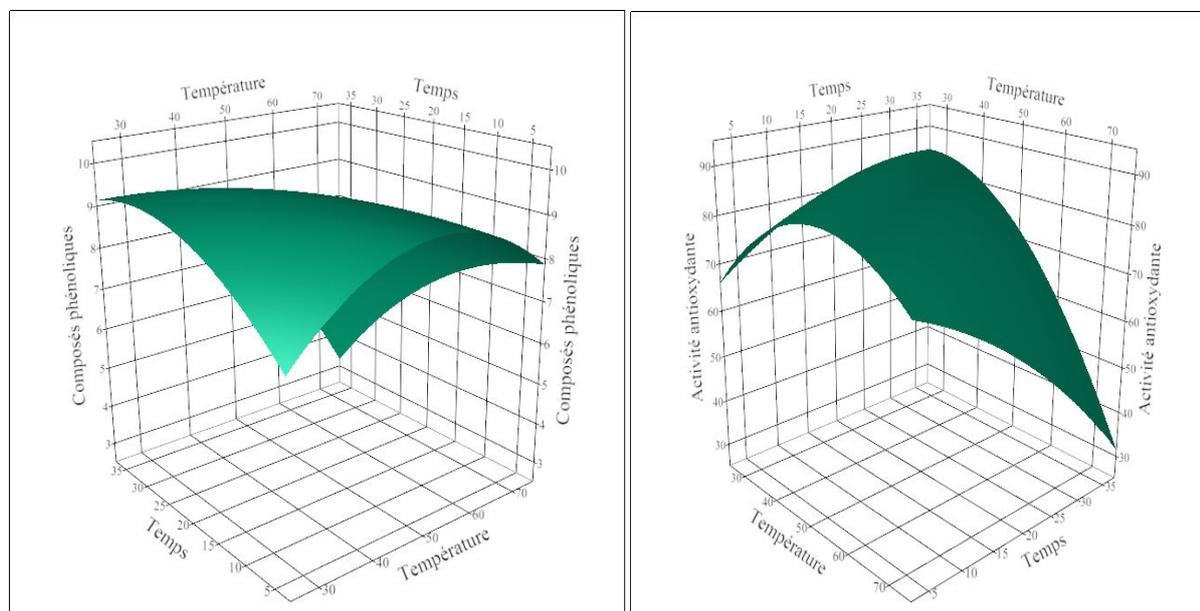
EAU où l'effondrement des bulles de cavitation ont détruit les composés dans le solvant par la pression la plus élevée (Nipornram et al., 2018).



(A)

(B)

Figure N°14 : Représentation spatiale des modèles de surfaces de réponses de l'effet de la concentration du solvant et de la température d'extraction sur l'extraction de PPT (A) et l'AA (B) des déchets de mandarine.



(A)

(B)

Figure N°15 : Représentation spatiale des modèles de surfaces de réponses de l'effet de la température et du temps d'extraction sur l'extraction de PPT (A) et l'AA (B) des déchets de mandarine.

Les **figures 16A et 16B** illustrent la représentation en trois dimensions des effets de la concentration du solvant et du temps sur l'extraction des PPT et l'AA de la poudre des déchets de mandarine. L'effet de la concentration montre une forte influence sur la teneur en PPT et sur l'AA d'une manière quadratique, ce qui explique que la polarité du solvant est un facteur fondamental dans l'extraction des composés phénoliques (**BOURGOU et al., 2016**).

Le taux d'extraction des antioxydants augmente aussi avec l'augmentation de la concentration avec un maximum d'extraction à une concentration de 56,65% au delà, la teneur en composés phénoliques diminue.

Concernant le temps d'extraction, les effets linéaire et quadratique sur l'extraction des CP sont significatifs, tandis que sur l'AA l'effet quadratique n'est pas significatif indiquant que l'extraction des antioxydants augmente et atteint un pic à 17,46 min puis elle diminue en raison de la dégradation des composés phénoliques suite au contact prolongé avec le solvant (**BOURGOU et al., 2016**).

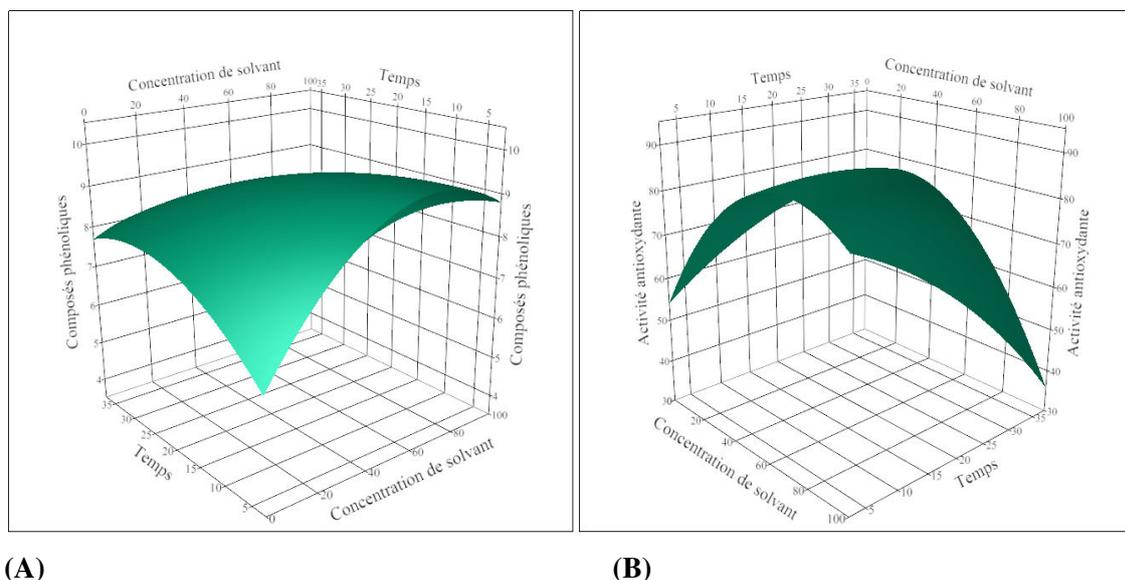


Figure N°16: Représentation spatiale des modèles de surfaces de réponses de l'effet de la concentration du solvant d'extraction et du temps sur l'extraction de PPT (A) et l'AA (B) des déchets de mandarine.

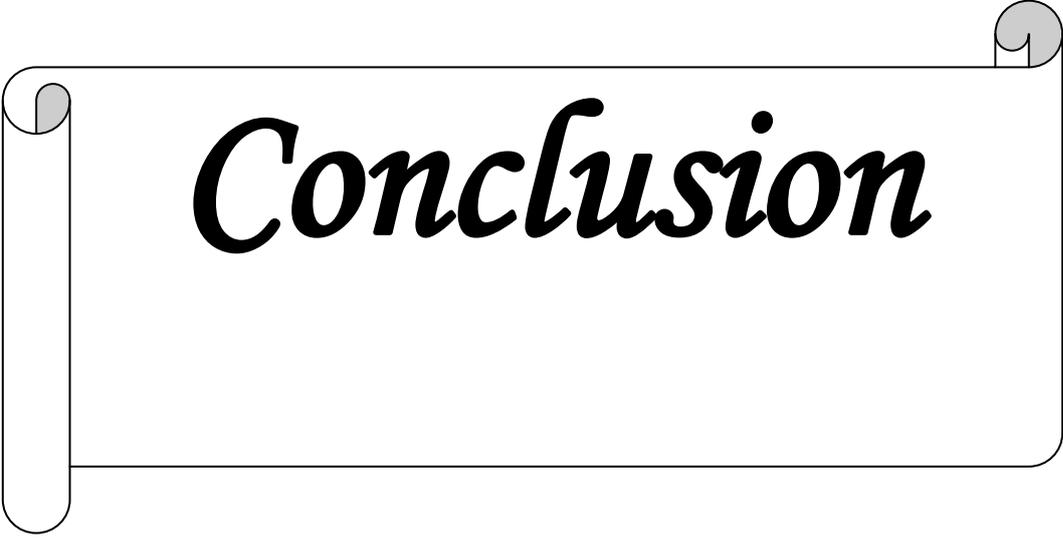
III.2.6. Détermination des conditions optimales

Les conditions requises pour maximiser l'extraction des PPT et de l'AA sont déterminés à l'aide du logiciel JMP. Les niveaux des trois facteurs étudiés concentration du solvant, temps et température d'extraction sont l'acétone 56,65% à 17,43 min et à 40,47°C. Ces conditions permettent de donner des prédictions de 967.1 mg EAG/100g MS pour les CP et un taux de 85,98% pour l'AA (**tableau N° XIV**).

Tableau N°XIII: Conditions et valeurs optimales pour l'extraction des PPT et l'AA de la poudre des déchets de mandarine par la MSR.

Paramètre optimisé	Valeur optimale
Température d'extraction	40,47 °C
Concentration du solvant	56,65 %
Temps d'extraction	17,42 min
Composés phénoliques	967,1 mg EAG/100 g MS
Activité antioxydante	85,98 %

Afin de confirmer les résultats obtenus par la MSR et le plan BBD sur l'optimisation d'extraction des polyphénols ainsi que sur l'activité antioxydante de la poudre des déchets (écorces et pépins) de mandarine, une éventuelle extraction a été effectuée. Les résultats obtenus (956,8 mg EAG/100 g MS et 86,45%, respectivement) sont très proches des résultats prédits (967,1 mg EAG/100 g MS et 85,98 %, respectivement).



Conclusion

Les sous produits de la mandarine constitue une source inépuisable de composés bioactifs, tels les métabolites secondaires « les polyphénols ». L'isolement et la caractérisation de ces composés constituent un sujet de recherche très étendu.

Pour une efficacité d'extraction des composés bioactifs à partir de la poudre d'écorces de mandarine la technique d'extraction assistée par ultrasons (EAU) a été utilisée. La présente étude vise à l'optimisation des conditions d'extraction par ultrasons des composés phénolique et de l'activité antioxydante à partir des déchets (écorces et pépins) de la mandarine commune (*Citrus reticulata* Blanco) par application de la méthodologie de surface de réponse (MSR).

Une étude préliminaire a été effectuée pour évaluer l'effet de différents facteurs à savoir la concentration du solvant (acétone 20%, 40%, 60%, 80% et 100%), la température d'extraction (20°, 30°, 40°, 50°, 60° et 70°C), le rapport solide/liquide (ratio : 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, et 1/50), ainsi que le temps d'extraction (10 min, 15 min, 20 min, 25 min et 30 min) sur le rendement en polyphénols ainsi que leur activité antioxydante, avec un degré de signification des données ($p < 0,05$).

Le rendement le plus élevé a été obtenu à une température de 60°C, temps 25 min, ration 1/40 (g/ml) et une concentration en acétone 50% avec des teneurs de 1259,39±17,34 mg EAG/100 g de MS en PPT et 83,59±0,21% pour l'AA.

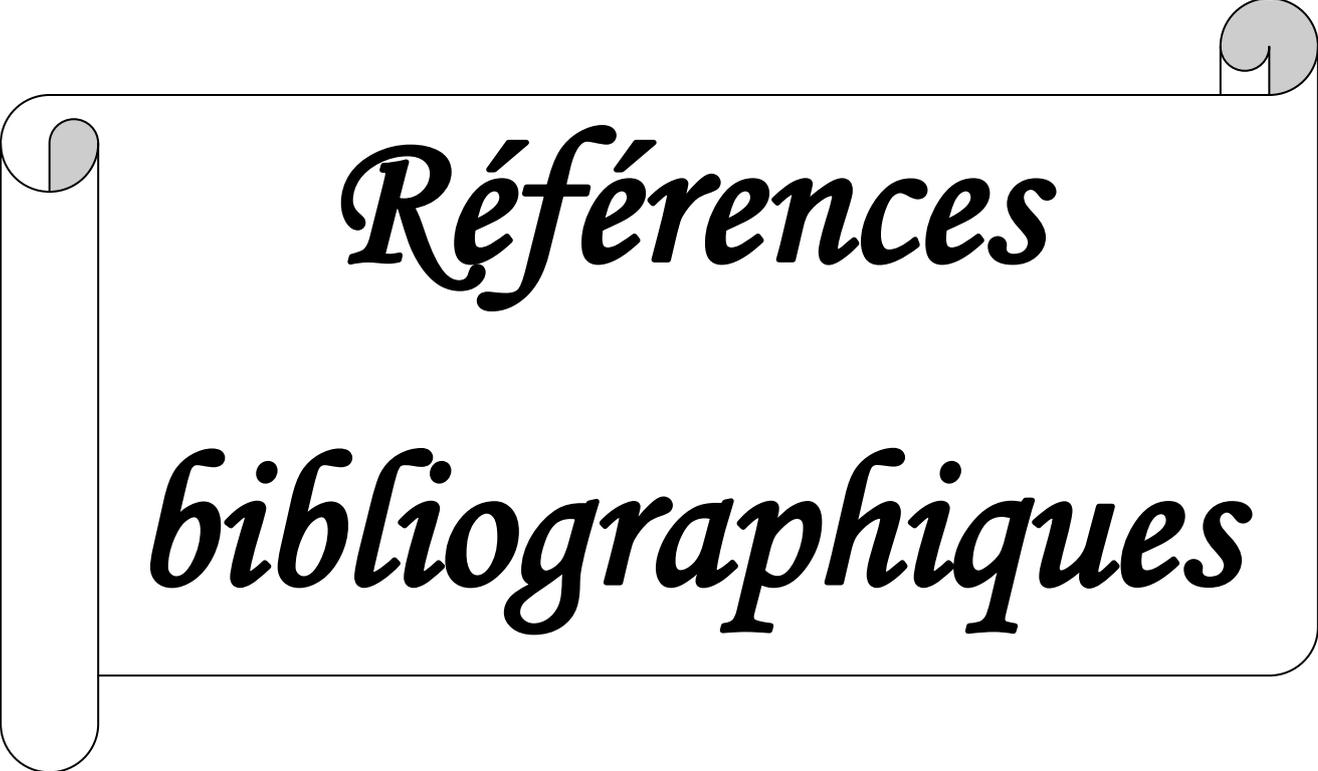
L'optimisation des conditions optimales d'extraction a été réalisée par le model Box-Behnken (BBD) pour étudier les effets d'interaction des trois variables étudiées (la température (30-70°C), la concentration en acétone (10-90) ainsi que le temps d'extraction (5-35 min) sur les deux réponses étudiées qui sont les PPT ainsi que l'AA.

L'analyse de la régression linéaire a montré que 96% de la variation était expliqué par les modèles. Une valeur insignifiante de la probabilité P pour le manque d'ajustement a confirmé la validité des modèles. L'analyse de la surface des réponses a révélé l'acétone à 56,65%, à un temps 17,42 min et à une température de 40,47°C comme conditions optimales d'extraction dont les valeurs expérimentales correspondantes pour les CPT et l'activité antioxydante étaient de 967,1 mg EAG/100 g de MS et de 85,98% respectivement.

Les valeurs expérimentales sont conformes à celles prédites, indiquant la pertinence du modèle et le succès de MSR pour l'optimisation des conditions d'extraction des PPT et de l'évaluation de l'AA à partir de la poudre des écorces de mandarine.

En perspective, il serait très intéressant d'approfondir cette étude par :

- ✓ La caractérisation des composés bioactifs des extraits obtenus ;
- ✓ L'étude de l'activité anti-inflammatoire, microbienne...etc des extraits ;
- ✓ Et l'élargissement de l'étude sur d'autres déchets d'agrumes.



Références

bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Ammar AH, Zagrouba F and Romdhane M (2010) Optimization of operating conditions of Tunisian myrtle (*Myrtus communis* L.) essential oil extraction by a hydrodistillation process using a 24 complete factorial design. *Flavour and Fragrance journal* **25**:503-507.
- Amor BB (2008) Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs: texturation par détente instantanée contrôlée (DIC), Université de La Rochelle.

B

- Bachir MB, Meziant L, Benchikh Y and Louaileche H (2014) Deployment of response surface methodology to optimize recovery of dark fresh fig (*Ficus carica* L., var. Azenjar) total phenolic compounds and antioxidant activity. *Food chemistry* **162**:277-282.
- Bampidis V and Robinson P (2006) Citrus by-products as ruminant feeds: A review. *Animal Feed Science and Technology* **128**:175-217.
- Bejar AK, Ghanem N, Mihoubi D, Kechaou N and Mihoubi NB (2011) Effect of infrared drying on drying kinetics, color, total phenols and water and oil holding capacities of orange (*Citrus sinensis*) peel and leaves. *International journal of food engineering* **7**.
- Boizot N and Charpentier J-P (2006) Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'INRA, In: Numéro spécial*:79-82.
- Boubekri C (2014) Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques, Université Mohamed Khider Biskra.
- Boumerfeg S, Baghiani A, Djarmouni M, Ameni D, Adjadj M, Belkhiri F, Charef N, Khenouf S and Arrar L (2018) Inhibitory activity on xanthine oxidase and antioxidant properties of *Teucrium polium* L. extracts.
- BOURGOU S, BEJI RS, MEDINI F and KSOURI R (2016) Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Journal of New Sciences* **28**.
- BOUSBIA N (2011a) Extraction des antioxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires.

Bousbia N (2011b) Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires, Université d'Avignon.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**:248-254.

C

Celhay C (2013) Fractionnement de coproduits de pin maritime (*Pinus pinaster*) et de peuplier (*Populus tremula*) pour l'obtention d'extraits polyphénoliques à activité antioxydante: procédé d'extraction aqueuse en extracteur bi-vis et étude des conditions subcritiques.

Chan S, Lee C, Yap C, Mustapha WAW and Ho C (2009) Optimisation of extraction conditions for phenolic compounds from limau purut (*Citrus hystrix*) peels. *International Food Research Journal* **16**:203-213.

Chapot H (1962) La mandarine commune. *Al Awamia* **5**:29-51.

Chavan Y and Singhal RS (2013) Ultrasound-assisted extraction (UAE) of bioactives from arecanut (*Areca catechu* L.) and optimization study using response surface methodology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **17**:106-113.

Chemat F and Khan MK (2011) Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics sonochemistry* **18**:813-835.

Chen R, Jin C, Tong Z, Lu J, Tan L, Tian L and Chang Q (2016) Optimization extraction, characterization and antioxidant activities of pectic polysaccharide from tangerine peels. *Carbohydrate polymers* **136**:187-197.

Cheok CY, Chin NL, Yusof YA, Talib RA and Law CL (2012) Optimization of total phenolic content extracted from *Garcinia mangostana* Linn. hull using response surface methodology versus artificial neural network. *Industrial Crops and Products* **40**:247-253.

D

Dahmoune F, Boulekbache L, Moussi K, Aoun O, Spigno G and Madani K (2013) Valorization of Citrus limon residues for the recovery of antioxidants: evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction. *Industrial Crops and Products* **50**:77-87.

de Moraes Barros HR, de Castro Ferreira TAP and Genovese MI (2012) Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. *Food chemistry* **134**:1892-1898.

- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P and Vidal N (2006) Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry* **97**:654-660.
- Doymaz I, Gorel O and Akgun N (2004) Drying characteristics of the solid by-product of olive oil extraction. *Biosystems Engineering* **88**:213-219.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers Pt and Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry* **28**:350-356.
- 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, Université de Lorraine.

E

- El Kantar S, Boussetta N, Rajha HN, Maroun RG, Louka N and Vorobiev E (2018) High voltage electrical discharges combined with enzymatic hydrolysis for extraction of polyphenols and fermentable sugars from orange peels. *Food Research International* **107**:755-762.
- Ellong EN, Billard C, Adenet S and Rochefort K (2015) Polyphenols, carotenoids, vitamin C content in tropical fruits and vegetables and impact of processing methods. *Food and Nutrition Sciences* **6**:299.
- Esclapez M, García-Pérez JV, Mulet A and Cárcel J (2011) Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Engineering Reviews* **3**:108.

F

- Fadil M, Farah A, Ihssane B, Haloui T and Rachiq S (2015) Optimisation des paramètres influençant l'hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis* L. par la méthodologie de surface de réponse Optimization of parameters influencing the hydrodistillation of *Rosmarinus officinalis* L. by response surface methodology. *J Mater Environ Sci* **6**:2346-2357.
- Fekih N Propriétés Chimiques et Biologiques des huiles essentielles de trois espèces du genre *Pinus* poussant en Algérie.
- Fuentes-Zaragoza E, Riquelme-Navarrete M, Sánchez-Zapata E and Pérez-Álvarez J (2010) Resistant starch as functional ingredient: A review. *Food Research International* **43**:931-942.

G

- Garcia-Salas P, Morales-Soto A, Segura-Carretero A and Fernández-Gutiérrez A (2010) Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules* **15**:8813-8826.
- Georgé S, Brat P, Alter P and Amiot MJ (2005) Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and food chemistry* **53**:1370-1373.
- Gérin M (2002) *Solvants industriels: Santé, sécurité, substitution*, Masson.
- Ghasemi K, Ghasemi Y and Ebrahimzadeh MA (2009) Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pak J Pharm Sci* **22**:277-281.
- Ghedira K (2005) Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* **3**:162-169.
- Goulas V and Manganaris GA (2012) Exploring the phytochemical content and the antioxidant potential of Citrus fruits grown in Cyprus. *Food chemistry* **131**:39-47.
- Goupy J and Creighton L (2006) *Introduction aux plans d'expériences*, Dunod Paris.
- Groubert A (1984) techniques d'extraction végétale.
- Guimarães R, Barros L, Barreira JC, Sousa MJ, Carvalho AM and Ferreira IC (2010) Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: grapefruit, lemon, lime and orange. *Food and Chemical Toxicology* **48**:99-106.

H

- Hayat K, Zhang X, Chen H, Xia S, Jia C and Zhong F (2010a) Liberation and separation of phenolic compounds from citrus mandarin peels by microwave heating and its effect on antioxidant activity. *Separation and Purification Technology* **73**:371-376.
- Hayat K, Zhang X, Farooq U, Abbas S, Xia S, Jia C, Zhong F and Zhang J (2010b) Effect of microwave treatment on phenolic content and antioxidant activity of citrus mandarin pomace. *Food chemistry* **123**:423-429.
- Hegazy A and Ibrahim M (2012) Antioxidant activities of orange peel extracts. *World Applied Sciences Journal* **18**:684-688.
- Hellal Z (2011) Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*), Université Mouloud Mammeri.

- Hemwimol S, Pavasant P and Shotipruk A (2006) Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Ultrasonics sonochemistry* **13**:543-548.
- Huang Y-S and Ho S-C (2010) Polymethoxy flavones are responsible for the anti-inflammatory activity of citrus fruit peel. *Food chemistry* **119**:868-873.
- Hughes DE (1983) Titrimetric determination of ascorbic acid with 2, 6-dichlorophenol indophenol in commercial liquid diets. *Journal of pharmaceutical sciences* **72**:126-129.

K

- Kader F, Rovel B and Metche M (1993) Role of invertase in sugar content in highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum*, L.). *LWT-Food Science and Technology* **26**:593-595.
- Khan MA, Ali M and Alam P (2010) Phytochemical investigation of the fruit peels of *Citrus reticulata* Blanco. *Natural product research* **24**:610-620.
- Klein B and Perry A (1982) Ascorbic acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of the United States. *Journal of Food Science* **47**:941-945.
- Kruger NJ (2009) The Bradford method for protein quantitation, in *The protein protocols handbook* pp 17-24, Springer.

L

- Lagha-Benamrouche S, Addar L, Boudershem H, Tani S and Madani K (2018) Caractérisation chimiques des écorces d'oranges, identification par GC-MS et évaluation du pouvoir antioxydant de leurs huiles essentielles. *Nature & Technology*:28-35.
- Lakshmi G, Smitha N, Ammu S, Priya C and Bhaskara R (2014) Phytochemical profile, in vitro antioxidant and hemolytic activities of various leaf extract of *Nymphaeanouchalilinn*: an in vitro study. *Int J Pharm Pharm Sci* **6**:548-552.
- Lapornik B, Prošek M and Wondra AG (2005) Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of food engineering* **71**:214-222.
- Ledesma-Escobar CA and de Castro MDL (2014) Towards a comprehensive exploitation of citrus. *Trends in food science & technology* **39**:63-75.
- LEYBROS J and FREMEAUX P (1990) Extraction solide-liquide. I. Aspects théoriques. *Techniques de l'ingénieur Génie des procédés* **2**:J2780. 2781-J2780. 2721.

Li B, Smith B and Hossain MM (2006) Extraction of phenolics from citrus peels: I. Solvent extraction method. *Separation and Purification Technology* **48**:182-188.

Lim TK (2012) *Edible medicinal and non-medicinal plants*, Springer.

Luque-Garcia J and De Castro ML (2003) Ultrasound: a powerful tool for leaching. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **22**:41-47.

M

M'Hiri N (2015) Étude comparative de l'effet des méthodes d'extraction sur les phénols et l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange «Maltaise demi sanguine» et exploration de l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier au carbone, Université de Lorraine.

Maisuthisakul P, Pasuk S and Ritthiruangdej P (2008) Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *Journal of Food Composition and Analysis* **21**:229-240.

Manohar M, Joseph J, Selvaraj T and Sivakumar D (2013) Application of Box Behnken design to optimize the parameters for turning Inconel 718 using coated carbide tools. *International Journal of Scientific & Engineering Research* **4**:620-644.

Mansouri A, Embarek G, Kokkalou E and Kefalas P (2005) Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food chemistry* **89**:411-420.

Maran JP, Manikandan S, Nivetha CV and Dinesh R (2017) Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel using central composite face centered response surface design. *Arabian Journal of Chemistry* **10**:S1145-S1157.

Marti-mestres G, Laget J, Maillols H and Fernandez C (1998) Solubilisation de filtres-UV dans des melanges ternaires de phases apolaires, optimisation par l'utilisation de reseaux centres. *International journal of cosmetic science* **20**:19-30.

Mason T, Paniwnyk L and Chemat F (2003) Ultrasound as a preservation technology, in *Food preservation techniques* pp 303-337, Elsevier.

Mason T, Paniwnyk L and Lorimer J (1996) The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics sonochemistry* **3**:S253-S260.

Meziant L, Benchikh Y and Louaileche H (2014) Deployment of response surface methodology to optimize recovery of dark fresh fig (*Ficus carica* L., var. Azenjar) total phenolic compounds and antioxidant activity. *Food chemistry* **162**:277-282.

Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry* **31**:426-428.

Missaoui R (2018) Extraction verte et caractérisation des molécules bioactives dans les coproduits de la production d'asperge (*Asparagus officinalis* L.).

Mohammedi H, Mamouzi S, Allal C, Ghaffor M, Rabhi H and Abbadi M (1989) Rapid and sensitive micromethod for protein determination by the Coomassie-blue technique. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algerie Institut Pasteur d'Algerie* **57**:151-162.

N

Nagendra Prasad M, Sanjay K, Shravya Khatokar M, Vismaya M and Nanjunda Swamy S (2011) Health benefits of rice bran-a review. *J Nutr Food Sci* **1**:1-7.

Nève J (2002) Modulation de l'apport alimentaire en anti-oxydants. *Nutrition clinique et métabolisme* **16**:292-300.

Nipornram S, Tochampa W, Rattanatraiwong P and Singanusong R (2018) Optimization of low power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampueng) peel. *Food chemistry* **241**:338-345.

R

Ragonese R, Macka M, Hughes J and Petocz P (2002) The use of the Box–Behnken experimental design in the optimisation and robustness testing of a capillary electrophoresis method for the analysis of ethambutol hydrochloride in a pharmaceutical formulation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **27**:995-1007.

Ramful D, Bahorun T, Bourdon E, Tarnus E and Aruoma OI (2010) Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology* **278**:75-87.

Ramful D, Tarnus E, Aruoma OI, Bourdon E and Bahorun T (2011) Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps. *Food Research International* **44**:2088-2099.

Ribéreau-Gayon P (1968) *Les Composés phénoliques des végétaux: par Pascal Ribéreau-Gayon*, Dunod.

S

Saffidine K (2018) Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *carthamus caeruleus* L. et de *plantago major* L.

- Şahin S and Şamlı R (2013) Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics sonochemistry* **20**:595-602.
- Sališová M, Toma Š and Mason T (1997) Comparison of conventional and ultrasonically assisted extractions of pharmaceutically active compounds from *Salvia officinalis*. *Ultrasonics sonochemistry* **4**:131-134.
- Singanusong R, Nipornram S, Tochampa W and Rattanatraiwong P (2015) Low power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampueng) and lime (*Citrus aurantifolia*) peels and the antioxidant. *Food Analytical Methods* **8**:1112-1123.
- Singh S and Immanuel G (2014) Extraction of antioxidants from fruit peels and its utilization in paneer. *Journal of Food Processing & Technology* **5**:1.
- Singleton VL and Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture* **16**:144-158.

T

- Taleb Née Bouderaa H (2015) Optimisation des conditions d'extraction des polyphénols par micro-ondes et ultrasons des feuilles de *Foeniculum vulgare* par la méthodologie de surface de réponse.
- Tinsson W (2010) Outils mathématiques pour les plans d'expérience, in *Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques* pp 39-73, Springer.

U

- Uma D, Ho C and Wan Aida W (2010) Optimization of extraction parameters of total phenolic compounds from henna (*Lawsonia inermis*) leaves. *Sains Malaysiana* **39**:119-128.

USDA (United States Department of Agriculture). 2017. Citrus: World Markets and Trade.

W

- Wang Y-C, Chuang Y-C and Hsu H-W (2008) The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. *Food chemistry* **106**:277-284.
- WANG Y-f and WANG C-g (2005) The Application of Response Surface Methodology [J]. *Journal of The Central University For Nationalities (Natural Science Edition)* **3**.

X

Xu G, Chen J, Liu D, Zhang Y, Jiang P and Ye X (2008) Minerals, phenolic compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water. *Journal of Food Science* **73**:C11-C18.

Y

Yang Y-C, Wei M-C, Huang T-C, Lee S-Z and Lin S-S (2013) Comparison of modified ultrasound-assisted and traditional extraction methods for the extraction of baicalin and baicalein from Radix Scutellariae. *Industrial Crops and Products* **45**:182-190.

Site internet

<http://www.reporters.dz>



Annexes

Annexe I

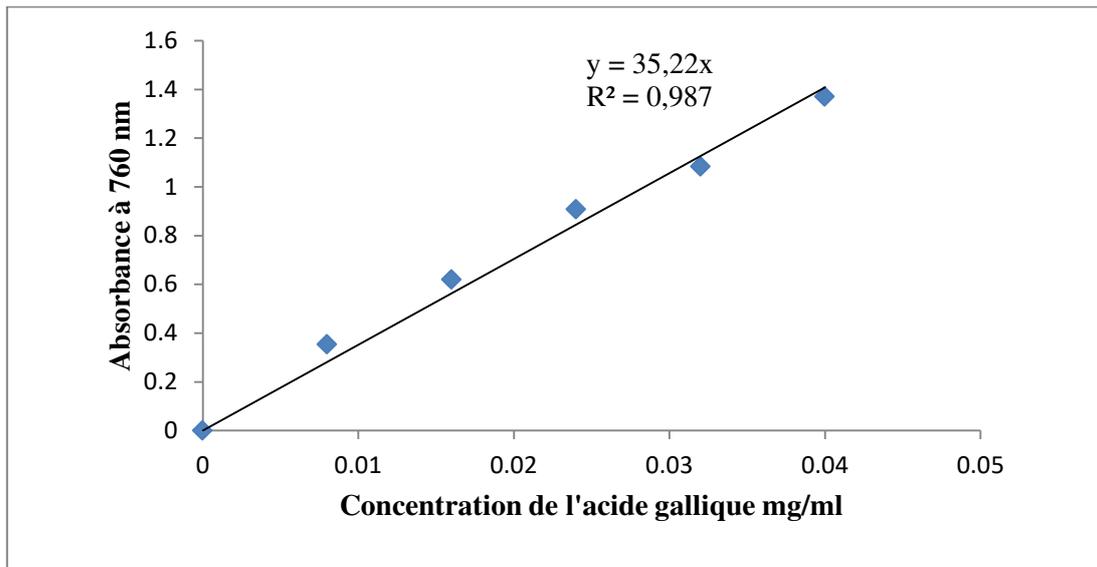


Figure N°17 : Courbe d'étalonnage des composés phénoliques

Annexe II

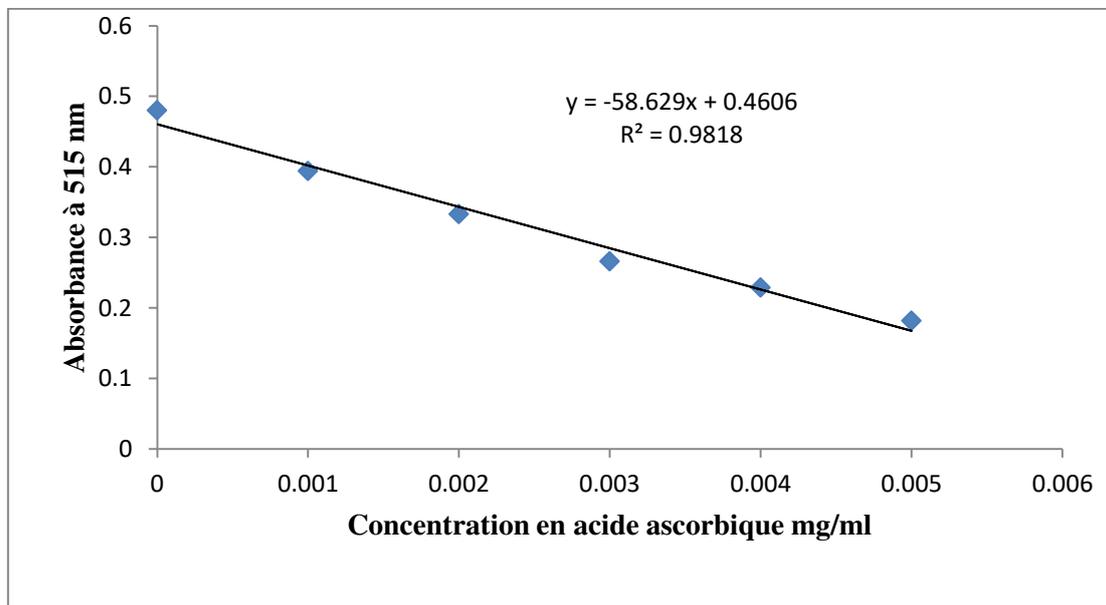


Figure N°18 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique

Annexe III

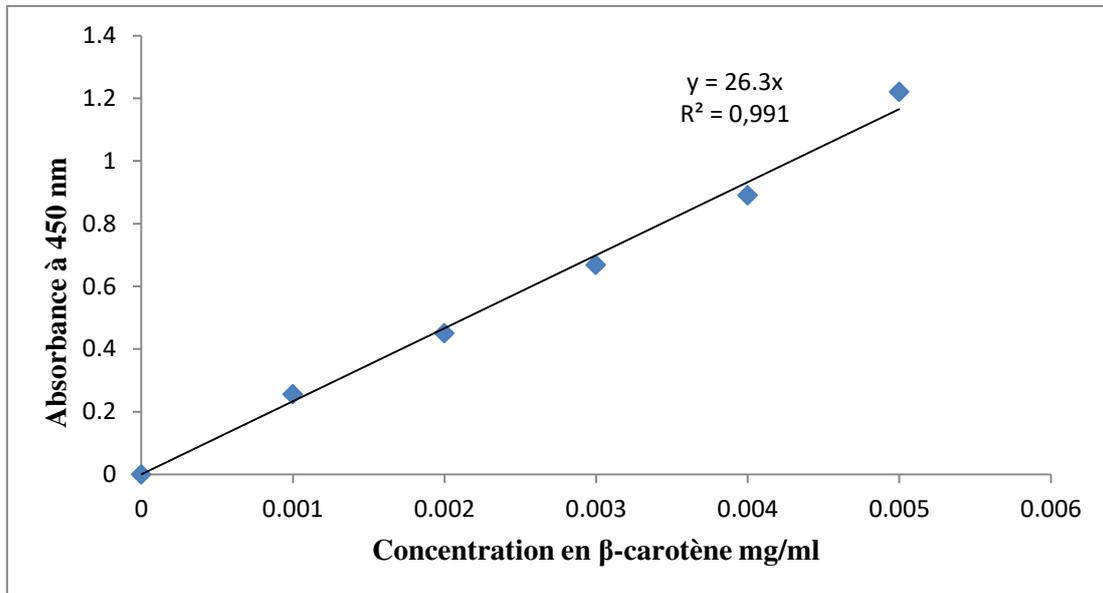


Figure N°19 : Courbe d'étalonnage des caroténoïdes

Annexe IV

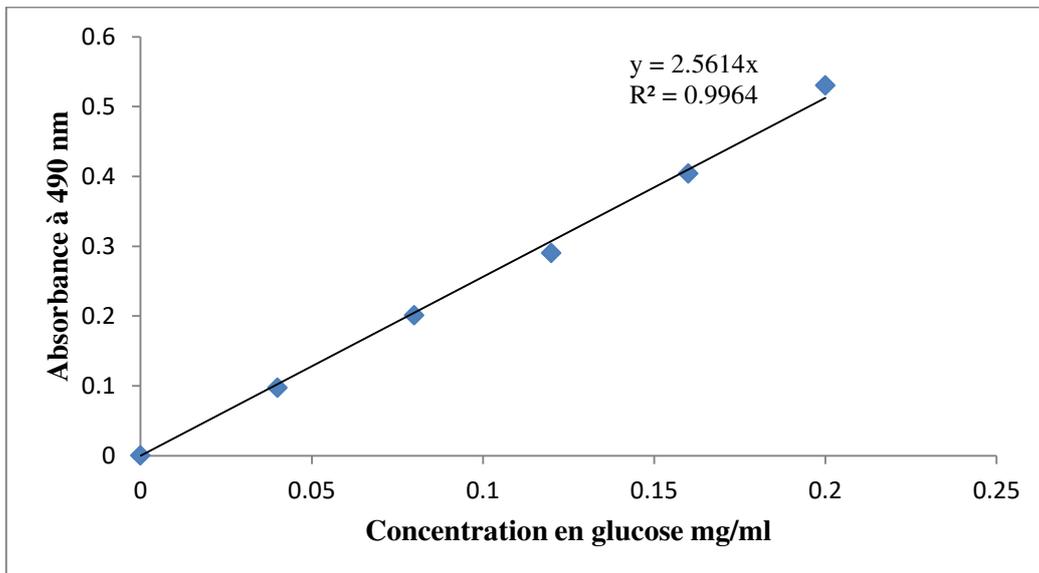


Figure N°20 : Courbe d'étalonnage des sucres totaux

Annexe V

Dosage des sucres réducteur Miller (1959)

Composition du DNS

- DNS.....5 g ;
- Soude8 g ;
- Tartrate double sodium potassium.....150 g ;
- Eau distillé.....500 ml.

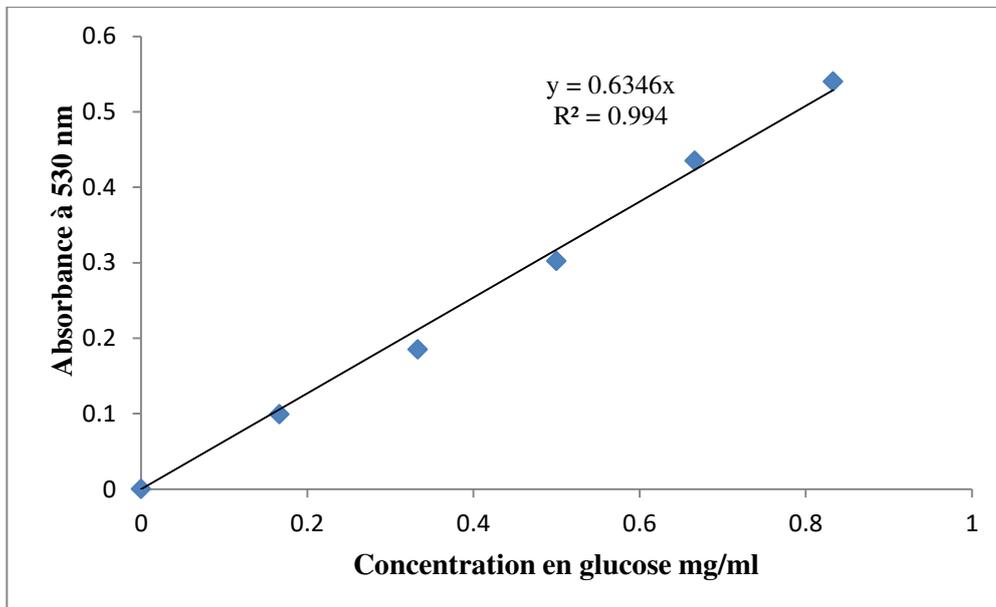
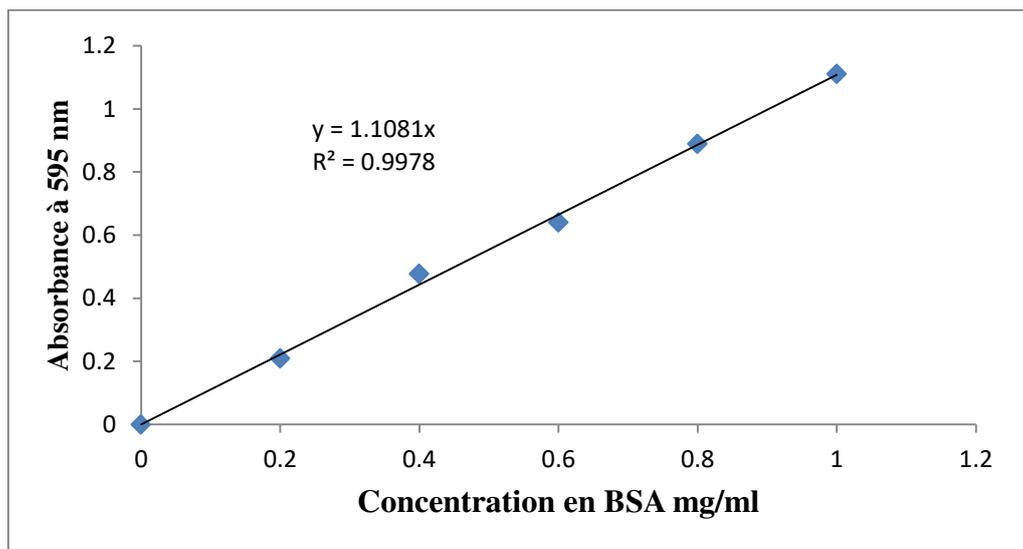


Figure N°21 : Courbe d'étalonnage des sucres réducteurs

Annexe VI : Dosage des protéines Bradford (1976).**Composition du bleu de coomassie**

- BBC G-250100 mg ;
- Ethanol absolu50 ml ;
- Acide phosphorique à 85%..... 100 ml :
- Compléter à 1000 ml avec l'eau distillée ;
- Conservation pendant 3 semaines à 4 °C et à l'abri de la lumière.

**Figure N°22 : Courbe d'étalonnage des protéines**

Annexe VII

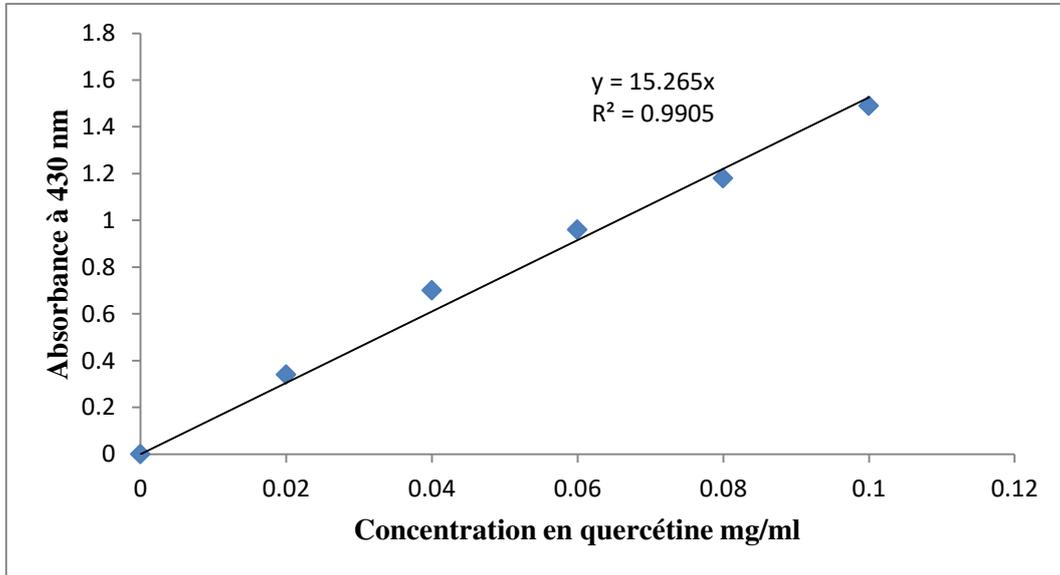


Figure N°23: Courbe d'étalonnage des flavonoïdes

Annexe VIII

Tableau XIII: Résultats en PPT ainsi que l'AA de la poudre des déchets de mandarine obtenus dans l'étude préliminaire

Types de solvant			Concentrations du solvant (%)			Températures d'extraction (°C)		
	PPT (mg EAG/100 g)	DPPH (%)		PPT (mg EAG/100 g)	DPPH (%)		PPT (mg EAG/100 g)	DPPH (%)
Eau	554,56±13,24	62,41±0,82	20%	648,12±23,37	68,49±0,04	20°	665,66±17,06	74,89±0,81
Acétone 50%	826,55±6,58	86,31±0,15	40%	758,41±8,18	83,18±0,57	30°	811,16±26,13	77,17±0,24
Méthanol 50%	781,25±23,05	83,46±0,36	50%	826,55±6,58	86,31±0,15	40°	832,73±9,17	83,86±0,11
Ethanol 50%	755,38±28,81	83,34±0,43	60%	809,77±15,37	85,34±0,14	50°	888,25±19,19	84,46±0,09
			80%	756,64±10,55	85,00±0,17	60°	984,42±6,87	88,62±0,2
			100%	441,86±21,13	61,20±0,12	70°	808,38±3,53	76,27±0,16

Annexe IX

Tableau IVX: Suite des résultats en PPT ainsi que l'AA de la poudre des déchets de mandarine obtenus dans l'étude préliminaire

Ratio (Solide/liquide) (1g/V ml)			Temps d'extraction (min)		
	PPT (mg EAG/100 g)	DPPH (%)		PPT (mg EAG/100 g)	DPPH (%)
10 ml	510,57±10,17	77,75±0,48	10 min	988,83±22,58	80,55±0,15
20 ml	968,39±14,29	84,01±0,21	15 min	1063,79±16,43	81,72±0,12
30 ml	979,75±1,83	84,81±0,14	20 min	1142,79±17,76	83,17±0,25
40 ml	1162,22±7,98	85,91±0,21	25 min	1259,39±17,34	83,59±0,21
50 ml	1024,51±21,78	83,35±0,27	30 min	1212,95±14,71	81,33±0,42

Résumé

L'analyse des paramètres physico-chimiques des déchets (écorces et pépins) de la mandarine commune a présenté une teneur élevée en eau (76,4%), les teneurs en protéine, sucres totaux et sucres réducteurs enregistrées étaient de 7,21 ; 21,82 et 18,14 g/100 MS, respectivement. Les cendres, vitamine C, caroténoïdes et flavonoïdes représentaient 3,86% ; 37,98 ; 254,42 mg/100 g MF et 677,44 mg/100 g MS respectivement.

Une étude préliminaire a été effectuée pour évaluer l'effet de différents facteurs à savoir la concentration du solvant (acétone 20%, 40%, 60%, 80% et 100%), la température d'extraction (20°, 30°, 40°, 50°, 60° et 70°C), le rapport solide/liquide (ratio : 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, et 1/50), ainsi que le temps d'extraction (10 min, 15 min, 20 min, 25 min et 30 min) sur le rendement en polyphénols ainsi que leur activité antioxydante, avec un degré de signification des données ($p < 0,05$).

Le rendement le plus élevé a été obtenu à une température de 60°C, temps 25 min, ration 1/40 (g/ml) et une concentration en acétone 50% avec des teneurs de 1259,39±17.34 mg EAG/100 g de MS en PPT et 83,59±0,21% pour l'AA.

Les conditions optimales d'extraction des polyphénols totaux (PPT) et l'activité antioxydante des déchets de mandarine commune (*Citrus reticulata* blanco) ont été étudiées à l'aide de la méthodologie de la surface de réponse (MSR). Le modèle Box-Behnken a été utilisé pour étudier les effets de trois variables indépendantes, température (30 à 70°C), la concentration en acétone (10 à 90%) et la et le temps (5 à 35 min) sur les réponses. L'analyse de régression a montré qu'environ 96% de la variation était expliquée par les modèles. La valeur de la probabilité pour le manque d'ajustement était insignifiante, ce qui a confirmé la validité des modèles. L'analyse de la surface de réponse a montré que les paramètres d'extraction optimaux permettant d'optimiser l'extraction des antioxydants étaient 56,65% d'acétone, 17,42 min et 40,47°C.

Dans des conditions optimales, les valeurs expérimentales correspondantes pour les PPT et l'activité antioxydant étaient de 967,1 mg EAG/100 g de MS et de 85,98% respectivement.

Les valeurs expérimentales sont conformes à celles prédites, indiquant la pertinence du modèle et le succès de MSR dans l'optimisation des conditions d'extraction des PPT à partir des déchets de mandarine.

Mot clefs : Déchets de mandarine (Ecorces et pépins), Etude préliminaire, Optimisation de l'extraction, Méthodologie de surface de réponse, Composés phénoliques totaux, Activité antioxydante.

Abstract

The physico-chemical parameters analysis of a common mandarin waste (peels and seeds) presented a high value of water content (76.4%). Total protein, total sugars and reducing sugars recorded were 7.21, 21.82 and 18.14 g/100 g DM, respectively. The ashes, vitamin C, carotenoids and flavonoids represented 3.86%, 37.98, 254.42 mg/100 g FM and 677.44 mg/100 g DM respectively.

A preliminary study was carried out to evaluate the effect of various factors namely the concentration of the solvent (acetone 20%, 40%, 60%, 80% and 100%), the extraction temperature (20 °, 30°, 40°, 50°, 60° and 70°C), the solid / liquid ratio (ratio: 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, and 1/50), as well as the time of extraction (10 min, 15 min, 20 min, 25 min and 30 min) on the yield of phenolic compounds and their antioxidant activity, with a degree of significance of the data ($p < 0.05$).

The highest yield was obtained at a temperature of 60°C, time 25 min, ration 1/40 (g/ml) and a concentration of acetone 50% with contents of 1259.39 ± 17.34 mg GAE / 100 g of DM in TPC and 83.59 ± 0.21% for AA.

Optimum conditions for extracting total phenolic compounds (TPC) and antioxidant activity from common mandarin waste (*Citrus reticulata* blanco) have been investigated using response surface methodology (RSM). The Box-Behnken design was used to investigate the effects of three independent variables, temperature (30-70°C), acetone concentration (10-90%) and time (5-35min), on the responses. Regression analysis showed that about 96% of the variation was explained by the models. P-value for the lack of fit was insignificant which confirmed the validity of models. Response surface analysis showed that the optimal extraction parameters that maximized antioxidants extraction were 40.47°C, 56.65% acetone and 17.42 min.

Under optimum conditions the corresponding experimental values for TPC and antioxidant activity were 967.1 mg GAE/100 g DM and 85.98% respectively.

The experimental values are in accordance with those predicted, indicating the suitability of the model and the success of RSM in optimizing TPC extraction conditions from waste mandarin.

Keywords : Mandarin waste (Peels and seeds), Preliminary study, Optimization of extraction, Response surface methodology, Total phenolic compounds, Antioxidant activity