

الشعبية الديمقراطية الجزائرية الجمهورية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université M'hamed Bougara Boumerdes

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Département : Génie des Procédés

Filière : Génie Alimentaire

Option : Qualité et conservation des aliments

THEME

**Synthèse bibliographique sur les travaux d'utilisation alimentaire
des écorces de grenade**

Présenté par : **ZANAZ Farida**
BOUSALEM Sihem

Jury:

President :	BEN AKMOUM A.	MCA	UMBB
Examineur :	MEGDOUD Dj.	MAA	UMBB
Promoteur :	ZIDANI S.	MCB	UMBB

Promotion 2020

RESUME

L'écorce de la grenade est riche en polyphénols principalement l'acide punicalagique et l'acide élagique. Vu cette composition, la poudre d'écorce de grenade s'accommode parfaitement pour l'élaboration des nouveaux produits. La poudre d'écorce de grenade a été utilisée pour l'enrichissement des produits alimentaire (le yourte, leben, boisson bitter). Pour masquer l'astringence et faciliter sont utilisation la poudre d'écorce de grenade peut être présenté sous forme de microcapsule.

La poudre d'écorce de grenade est douée d'une activité antibactérienne et antioxydante avec des résultats concluent. La poudre d'écorce de grenade n'a pas d'effet sur l'activité des ferments lactique utilises dans l'industrie laitière.

Mot clés : Poudre d'écorce de grenade ; enrichissement, l'astringence, micro encapsule.

ABSTRACT

The peel of the pomegranate is rich in polyphenols, mainly punicalagic acid and elagic acid. Given this composition, pomegranate peel powder works perfectly for the development of new products. Pomegranate bark powder has been used to fortify food products (yurt, leben, bitter drink). To mask astringency and facilitate its use, pomegranate peel powder can be presented in microcapsule form.

Pomegranate peel powder is endowed with antibacterial and antioxidant activity with conclusive results. Pomegranate peel powder has no effect on the activity of lactic acid bacteria used in the dairy industry.

Key words: Pomegranate bark powder; enrichment, astringency, micro encapsulates.

المخلص

قشرة ثمرة الرمان غنية بالبولىفينول وخاصة حمض البنكالاغيك وحمض الإيلاجيك. بالنظر إلى هذه التركيبية ، فإن مسحوق قشور الرمان يعمل بشكل مثالي لتطوير منتجات جديدة. تم استخدام مسحوق قشور الرمان في تقوية المنتجات الغذائية (الزبادي ، اللبن ، المشروب المر). لإخفاء قابلية القابض وتسهيل استخدامه، مسحوق قشور الرمان يمكن تعبئته على شكل كبسولة. يتمتع مسحوق قشور الرمان بنشاط مضاد للجراثيم ومضاد للأكسدة بنتائج حاسمة لا يؤثر مسحوق قشور الرمان على نشاط بكتيريا حمض اللاكتيك المستخدمة في صناعة الألبان.

كلمات البحث : مسحوق قشور الرمان؛ التخصيب ، القابض .

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification botanique du grenadier.....	2
Tableau 2: Composition nutritionnelle de grenade	4
Tableau 3 : composition chimique de la grenade	6
Tableau4 : structure chimique de composés phénoliques de la peau de grenade	9
Tableau 5: Gradient d'élution des composés phénoliques par HPLC.....	17
Tableau 6 : Caractéristiques physicochimiques de PEG.....	20
Tableau 7 : Activité antibactérienne de l'EAPPG et l'EEPPG.....	21
Tableau 8 : Caractérisations de l'EAPEG ; l'EEPEG et du BHT.....	23
Tableau 9 : Résultat du screening chimique de PPG.....	23
Tableau 10 : composition des microcapsules.....	27
Tableau11 : Résultats préliminaires d'essai d'incorporation dans un yaourt étuvé.....	30
Tableau 12: Les analyses physico chimique de la poudre d'écorce de grenade.....	32
Tableau 13: les différents paramètres selon le calcul de F.....	32
Tableau 14: les différents paramètres selon le calcul de F.....	34
Tableau 15 : les déférant formulation de yaourt	35

.

Liste des figures

Figure 1 : La grenade et ses différentes parties.....	3
Figure 2 : Ecorce de grenade.....	5
Figure 3 : Obtention et caractérisation de PEG.....	11
Figure 4 : Principales étapes pour l'obtention de l'extrait aqueux (EAPEG) et de l'extrait étheré (EEPEG) de la poudre de peau de grenade.....	12
Figure 5 : Chromatogramme des composés phénoliques de l'EAPPG	16
Figure 6 :Chromatogramme des composés phénoliques de l'EEPPG	16
Figure 7 ; la courbe d'étalonnage du DPPH.....	22
Figure 8 : Morphologie de particules obtenues par micro-encapsulation (a) microcapsule simple, (b) microsphère simple	25
Figure 9 : Structure de l'acide polygalacturonique des pectines.....	26
Figure 10 : les étapes de la préparation des microcapsules.....	28

Liste des abréviations

PEG : poudre d'écorce de grenade

EEPEG : extrait étheré poudre d'écorce de grenade

EAPEG : extrait aqueux poudre d'écorce de grenade

ACT : anthocyanes totaux

HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance

DPPH : 2,2 Diphenyl-1picryl hydrozyl

BHT : hydroxytoluènebutylé

EAG : équivalent acide gallique

CV : capsules vides

UV : ultraviolet

EC 50 : temps équivalent

AG : acide galacturonique

F : teste Friedman

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
Chapitre I : La grenade	
I-1. HISTORIQUE.....	2
I-2. CLASSIFICATION BOTANIQUE.....	2
I-3. COMPOSITION CHIMIQUE DE LA GRENADE.....	3
1-3-1- La partie comestible	3
- Pépin.....	3
- Pulpe (arille).....	4
1-3-2- les écorces de la grenade.....	4
I.4. COMPOSES PHENOLIQUES DE LA GRENA.....	7
• polyphénols.....	7
a) Tannins.....	7
a.1) Tannins hydrolysables.....	8
a.2) Tannins condensé.....	8
b) Flavonoïdes.....	8
c) Anthocyanines.....	8
I.5. STRUCTURE CHIMIQUE DES COMPOSES PHENOLIQUES DE LA PEAU DE GRENADE.....	9
I.6. CARACTERISATION DE L'ECORCE DE GRENADE.....	11
I.6.1. Méthode de dosage et identification des polyphénols de PEG.....	13
a- Screening chimique.....	13
b- Dosage des polyphénols totaux.....	13
c- Dosage des anthocyanes totaux.....	14
d- Dosage des flavonoïdes	15
e . Identification et quantification des composés phénoliques de PEG par HPLC.....	15

I.6.2. Evaluation de l'activité antioxydant des extraits de PEG par la méthode de DPP.....	17
I.6.3. Activité antibactérienne de la PEG.....	18
I.6.4. Caractéristiques physicochimique et biologiques de la poudre de l'écorce de grenade (PEG).....	20
I.6.4.1. Caractéristiques physicochimiques.....	20
I.6.4.2. Caractéristiques biologiques.....	21
I.6.4.3. Teneur en phénolique.....	23

Chapitre II : Synthèse des travaux sur la valorisation de la poudre de d'écorce de grenade

II.1. Introduction.....	24
II.2. Micro-encapsulation de la poudre de peau de grenade.....	24
II.2.1. Elaboration des micro capsules par un mélange pectine caséine.....	26
II.2.2. Procède de préparation des microcapsulea base de PEG.....	27
II.3. Incorporation de la PEG micro-encapsuledans le yaourt.....	29
II.3.1. Préparation	29
II.3.2. Résultats.....	30
II.3.3. Conclusion.....	31
II.4. Incorporation de PEG dans le l'ben.....	32
II.5. L'incorporation de PEG dans Boisson typ Bitter.....	33
II.6. L'incorporation de PEG dans yaourt en poudre	34
CONCLUSION	37

Remerciements

Louanges à Dieu, seigneur de l'univers qui nous a comblé de sa miséricorde jusqu'à la réalisation de ce modeste travail.

♥ *Et J'exprime mes profonds remerciements Mr Zidani Sofiane mon encadreur pour avoir d'abord proposé ce thème, pour suivi continuel tout le Long de la réalisation de ce mémoire, et qui n'a pas cessé de nous donner ses conseils et remarques.*

♥ *Je sincère remercie aux messieurs les membres de jury pour l'honneur qu'ils nous font en participant au jugement de ce travail.*

♥ *J'exprime notre profonde gratitude, et expressions de reconnaissance à Mr Akssas Hammouche chef de département génie des procédés université de Boumerdes.*

♥ *Mes remerciements aux techniciens des laboratoires du département génie des procédés pour leur contributions à notre réussite au terme de ce modeste travail notamment Hamida.*

Dédicace

Je dédie mon travail

A mes très chers parents qui m'ont encouragé

A mon marie

A mes enfants Abdelkarim et Imad elddine

A mes chers frères et sœurs

A mon cher binôme Farida et sa famille

A tous mes amies Radia et Amel et Nawel et Hamida

A toute ma famille

Sihem

Dédicace

Je dédie ce travail à ma chère famille qui m'a encouragé.

A ma chère maman Malika.

A mon marie qui m'a encouragé durant mon cursus.

A mes chers sœurs et frères

A mon cher binôme Sihem et sa famille.

A mes deux anges Razane et Wisso .

Farida

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION

Les plantes sont utilisées depuis longtemps par les populations locales pour le bien être qu'elles apportent ainsi que pour leurs vertus thérapeutique, elles sont aujourd'hui de véritables sources pour l'industrie pharmaceutique et agroalimentaire.

Le grenadier ou *Punica granatum* fait partie des espèces les plus anciennement connues, l'historique de son utilisation comme plante médicinale date de plus de 3000 ans (Bown, 1995).

Le fruit du grenadier, feuille, écorce et graines est riche en composés phénoliques (Fournier, 1948). (Afaq, 2005), cette composition lui a attribuée plusieurs propriétés aussi bien dans le domaine médicinale que dans le domaine agro-alimentaire, en effet des études ont confirmé que la grenade possède des propriétés antidiabétiques (Jafri, 2000), antimicrobiennes (Braga 2005) et anti cancérogènes (Malik, 2005), d'autres études ont montré que la grenade possède des propriétés anti oxydantes et anti microbienne contre la détérioration des produits alimentaires (Navaro-Marts, 2001), (di silvestro, 2009), cela justifie son utilisation comme agent de conservation naturelle car actuellement, il y a tendance à substituer les agents chimiques et synthétiques utilisés en industrie alimentaire par des bio molécules présentes dans les fruits, les légumes et les herbes aromatiques (Ayala- Zavala 2005) ayant une activité anti microbienne et anti oxydante.

Vu ses caractéristiques biologiques et physicochimiques elles seront intéressantes dans des différentes formulations alimentaires et non alimentaires.

Dans notre travail nous avons réalisé une synthèse bibliographique sur les caractéristiques physico-chimiques et biologiques de poudre de l'écorce de grenade PEG ainsi qu'une synthèse sur les travaux ultérieurs de ses différentes utilisations dans l'université de Boumerdes.

CHAPITRE I : LA GRENADE

I.1.Historique

La grenade est le fruit du grenadier (*Punica granatum*). Ce petit arbre buissonnant est originaire de bassin méditerranéen, d'Asie Occidentale et du Moyen-Orient, où il est cultivé depuis 5000 à 6000 ans. Son nom est dérivé du latin « granatum » qui signifie « fruit à grain » (QA international collectif, 1996). La grenade est souvent mentionnée dans la mythologie grecque, ainsi que dans la Bible et le Coran, preuve que ce fruit est connu et consommé depuis des millénaires. Outre la dimension symbolique dont elle était revêtue, la grenade était appréciée à l'époque pour les propriétés vermifuges de son écorce, mais aussi pour sa pulpe désaltérante et son aptitude à se conserver et à résister aux chocs, grâce à son écorce rigide.

Les voyageurs et les caravaniers l'emportaient donc avec eux comme provision de bouche: le grenadier s'est ainsi rapidement répandu vers l'Est (Asie) et vers l'Ouest (bassin méditerranéen), grâce aux pépins du fruit. Cet arbre fruitier est aujourd'hui cultivé un peu partout dans le monde, sous les climats chauds et secs (Calin S, 2005).

I.2.Classification botanique

Le grenadier, *Punica granatum*, a été décrit par Linné et introduit dans sa classification en 1753. Cette classification encore adoptée est décrite dans le Tableau 1 (Spichiger, 2009).

Tableau 1: Classification botanique du grenadier (Spichiger, 2009).

Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Myrtales</i>
Famille	<i>Punicaceae(Lythraceae)</i>
Genre	<i>Punica</i>
Espèce	<i>Punicagranatum</i>

I.3.Composition chimique de la grenade

Le fruit possède dans ses différentes parties de nombreux composés chimiques d'une valeur biologique élevée : écorce, membranes blanches, arilles et pépins (**Figure 1**).

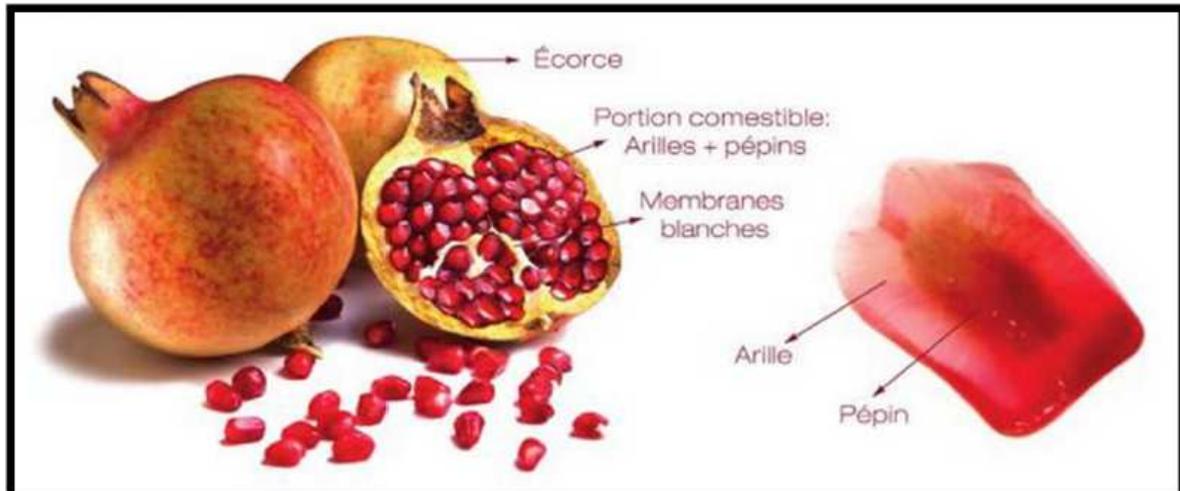


Figure 1 : La grenade et ses différentes parties (Calins, 2005).

1.3.1. La partie comestible

La partie comestible de la grenade représente environ 50% du poids total d'une grenade dont 80% sont les arilles (partie charnue) et 20% les pépins (partie ligneuse).

❖ Pépin

Les pépins de grenade contiennent 12 à 20% de matière grasse par rapport au poids de la graine, avec une prédominance des acides gras insaturés conjugués avec une teneur de 31,8-86,6% d'un acide gras très rare l'acide punique (cis 9, trans 11, cis 13) qui est un isomère de l'acide linoléique, 0,7- 24,4 % acide linoléique, 0,4-17,7 % oléique, 2,8- 16,7% stéarique et 0,3-9,9 % palmitique. 95% des acides gras sont sous forme estérifié, dont 99% de triacylglycérols (Meert., 2009 ; Kim., 2002). Ils contiennent des constituants mineurs de l'huile incluent les stérols et les stéroïdes sexuels (Lansky et Newman, 2007). Dont la plus forte concentration en estrone (stéroïdes sexuels) du règne végétal (Kim, 2002).

❖ Pulpe (arille)

Le jus de grenade a un pouvoir antioxydant trois fois supérieur au thé vert et vin rouge. Il est riche en vitamine: vitamine C, vitamine E et β -carotène, et en polyphénols: catéchine, acide éllagique, acide gallique et éllagitannins (*Okonogi., 2007 ; Çam., 2009*); c'est une source importante en anthocyanines : 3-glucoside et 3,5-di glucoside de delphinidine, cyanidine, et pelargonidine, antioxydants flavonoïdiques puissants, qui lui confèrent sa couleur éclatante, qui augmente en intensité au cours de la maturation (*Gil, 2000 ; Lansky et Newman,2007*).Ainsi que de l'acide citrique et malique et l'acide ascorbique (*Gil, 2000*). Le jus contient des minéraux tels que Fe qui est relativement fréquent, Ca, Ce, Cl, Co, Cr, Cs, Cu, K, Mg, Mn, Mo, Na, Rb, SC, Se, Sn, Sr, et Zn (*Lansky et Newman, 2007*).

Dans le tableau suivant, se trouvent résumées les valeurs nutritionnelles de la grenade pour 100 g de portion comestible. Les valeurs indiquées sont issues du fichier canadien sur les éléments nutritifs de 2007 (Tableau 2).

Tableau 2: Composition nutritionnelle de grenade (fruit) D'après la USD 2007

Nutriments	Valeur moyenne pour 100g
Eau (g)	80,97
Energie (Kcal)	68
Protéine	0,95
Graisse	0,30
Hydrates de carbone	17,17
Fibre diététique	0,6
Sucres totaux	16,57
Vitamines	
Vitamine C	6,1
Vitamine A	108
Vitamine E	0,60
Vitamine K	4,6
Autres	
Phytostérol	17
Cholestérol	0
α - carotène	50
β - carotène	40

1.3.2. Les écorces de la grenade

L'écorce du fruit du grenadier est également appelée « *malicorium* », il s'agit de la partie dure du fruit. Elle représente environ 50% du poids total de la grenade (Calin, 2005). Elle est généralement utilisée séchée, sous la forme de morceaux brunâtres ou vert rougeâtre à l'extérieur, un peu verruqueux, brillants, jaunâtre sur la face intérieure concave, portant souvent l'empreinte des graines qui y étaient incrustées. Ces fragments sont de consistance coriace, ils sont formés d'un parenchyme de cellules à paroi minces, au milieu desquelles on distingue des groupes de cellules pierreuses et des faisceaux libro-vasculaires. La saveur de l'écorce de grenade est amère et astringente (Wald, 2009).

L'écorce est une source très importante de composés bioactifs tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les ellagitannins, les proanthocyanidines et les minéraux, essentiellement du potassium, de l'azote, du calcium, du phosphore, du magnésium et du sodium. Elle est riche en tanins hydrosolubles, principalement en punicaline, pédunculagine et punicalagine (Calin Sanchez, 2005). Elle peut reformer jusqu'à 28% des tanins (Fournier, 1948). L'écorce est riche en substances antimicrobiennes et anti-oxydantes, protège le fruit des prédateurs et des agressions du rayonnement solaire (Curtay, 2010).

En outre, l'écorce du fruit contient également deux importants acides hydroxybenzoïques, l'acide gallique et l'acide éllagique. Elle renferme aussi des molécules de coloration jaunes et des anthocyanidines ; responsables de la couleur rouge des grenades (Hmid, 2014). Elle se compose également, d'acides gras, de catéchines, de quercitrines et de rutines (Ghazaleh, 2013).



Figure 02 : Ecorce de grenade

La composition chimique des différentes fractions de la grenade est donnée dans le tableau 3.

Tableau 3 : composition chimique de la grenade (Elodie 2009)

Partie du fruit	Composition
L'écorce de la grenade (Malicorium)	<ul style="list-style-type: none">• acide hydroxybenzoïque: l'acide gallique et l'acide ellagique• Acide hydroxycinnamique\• Dérivés de flavones: molécules de coloration jaune• Anthocyanidines: responsables de la couleur rouge des grenades• nombreux ellagitanins: tels que la punicaline, la punicalagine, la corilagine, la granatine A et la granatine B, ces tanins représentent jusqu'à 28% de la peau du fruit• La pelletière pourrait aussi se trouver dans la peau de la grenade
Le jus de grenade	<ul style="list-style-type: none">• Sucres: tels que le glucose, le fructose et le saccharose.• Acides organiques: l'acide citrique, l'acide ascorbique, l'acide gallique et l'acide ellagique.• Acide aminés: la valine, proline et méthionine.• Anthocyanines: puissantes molécules antioxydants, fournissant au jus de grenade, sa couleur rouge augmente jusqu'à maturité du fruit, et diminue après la pression du fruit.
Les graines	<ul style="list-style-type: none">• Huile : qui se compose :<ul style="list-style-type: none">- Acides gras insaturés (80%): l'acide punique, les acides oléiques et linoléiques et d'autres acides.- Acides gras saturés: les acides palmique et stéarique.• Hormones stéroïdiennes, nombreux stérols: le cholestérol

1.4. Composés phénoliques de la grenade

Les fruits de la grenade sont une source de divers composés biologiquement actifs, tels que des composés phénoliques comme l'acide ellagique, gallo-tannins, anthocyanines, qui sont connus pour agir en tant qu'antioxydants (*kkaplan, 2001 ; Nodae, 2002 ; Cerda, 2003*).

- **Polyphénols**

Les polyphénols constituent un des groupes les plus communs et largement répandus dans les plantes. Ils sont considérés comme des métabolites secondaires et ils n'ont pas de fonction métabolique spécifique dans les cellules végétales. Plus de mille polyphénols sont connus, ce sont des composés contenant un cycle aromatique avec un ou plusieurs groupes hydroxyles, ils peuvent être divisés en 15 grandes classes selon plusieurs structures chimiques. Certaines de ces classes sont des composés avec C6 aromatique, d'autres avec la structure C6-C1, et d'autres avec des squelettes plus complexes (*Bennick, 2002*).

Ce sont des constituants importants à propriétés organoleptiques des graines et des jus de grenade car ils donnent la couleur rouge attrayante et fournissent l'astringence douce qui est caractéristique de la saveur de la grenade (*Gil, 2000*).

Les polyphénols prédominants sont les flavonoïdes, les tannins condensés et les tanins hydrolysables (*Gil, 2000 ; Van Elswijk, 2004 ; Seeramet, 2006*).

a) Tannins

Les tannins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbres et des fruits (raisin, dattes, café, cacao ...). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation (*Hemingway, 1992*).

Les tannins confèrent un goût amer au jus de grenade et aux membranes blanches qui entourent les grains. Il a été rapporté que la grenade possède deux tannins à savoir l'acide ellagique et punicalagin qui ont un rôle important dans l'activité antioxydant (*Arjamand, 2011*).

a.1) Tannins hydrolysables

Les tannins hydrolysables sont des esters de glucides ou d'acides phénols, ou de dérivés d'acides phénols; les molécules glucidiques est en général du glucose, mais dans certains cas des polysaccharides (*Ribereau, 1968*).

L'intérêt des tannins hydrolysables de grenade dans divers domaines scientifiques et commerciaux a augmenté constamment vue leur intérêt dans le secteur alimentaire, car ces composés jouent un rôle important dans la qualité des aliments grâce à leur propriétés antioxydantes (*Arapitsas, 2012*).

a.2) Tannins condensés

Les tannins condensés sont trouvés dans la peau et le jus (*Arjamand, 2011*). La plupart des activités des tannins condensés dépendant en grande partie de leur structure, en particulier leur degré de polymérisation (*Arapitsas, 2012*).

b) Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des polyphénols naturels et complexes, présents sous forme de dérivées glucosidiques dans de nombreux fruits et légumes (*Alaiset., 2003*).

Les flavonoïdes sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. Ils sont présents dans les cellules épidermiques de feuilles et ils sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs des rayonnements UV (*Hadi, 2004*).

Il a été signalé que la grenade présente des principaux flavonoïdes à savoir la catéchine et la quercitrine, qui jouent un rôle important dans l'activité antioxydante (*Arjamand, 2011*).

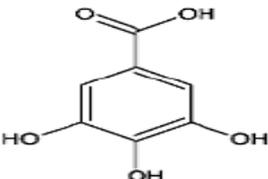
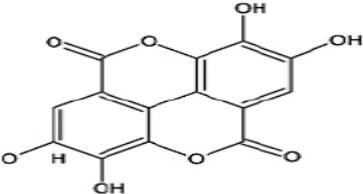
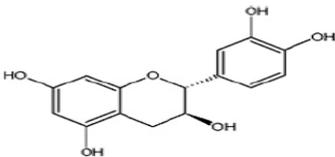
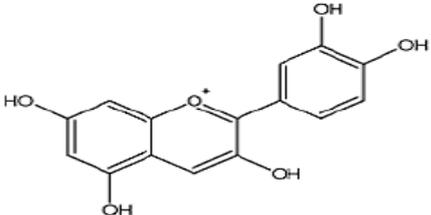
c) Anthocyanines

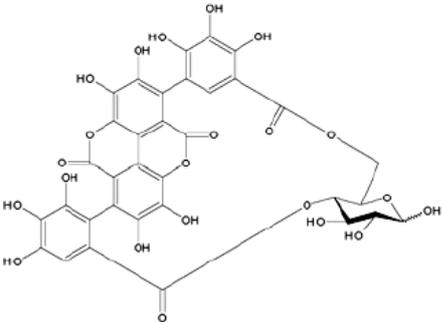
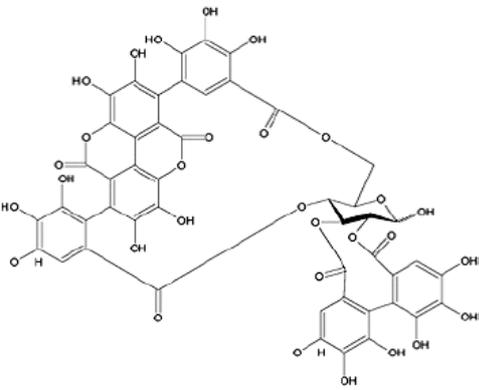
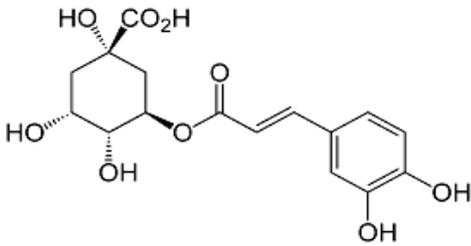
Ce sont des pigments vacuolaires rouges, roses, mauves, pourpres, bleu ou violet de la plupart des fleurs et des fruits (*Bruneton, 1993*). Ils sont caractérisés par l'engagement de l'hydroxyle en position 3 dans une liaison hétérosidique (les anthocyanosides). Ces pigments représentent des signaux visuels qui attirent les animaux pollinisateurs (insectes, oiseaux) (*Brouillard, 1997 in Bahorum, 1997*).

La composition en anthocyanines est un paramètre important de qualité du fruit de la grenade, en raison de l'importance de ces derniers dans la couleur des jus respectifs. Les anthocyanines dans la grenade changent considérablement avec les cultivars, maturité, le secteur de production et conditions saisonnières (Gil, 1995 ; Boročov-N, 2009).

1.5. Structure chimique des composés phénoliques de l'écorce de grenade

Tableau4 : Structure chimique des composés phénoliques de l'écorce de grenade (Hmide I, 2013).

Classe chimique	Nom du compose	Structure chimique
Acide hydroxybenzoïque	Acide gallique	
Acide hydroxybenzoïque	Acide éllagique	
Flavan-3-ols	Catéchine	
Anthocyanidine	Cyanidine	

<p>Ellagitannins</p>	<p>Punicalin</p>	
<p>Ellagitannins</p>	<p>Punicalagin</p>	
<p>Hydroxycinnamique (phenylpropanoids)</p>	<p>L'acide chlorogénique</p>	

I.6. Caractérisation de l'écorce de grenade

L'écorce de la grenade est riche en polyphénole principalement les tanins hydrolysable (punicaline, punicalagin pedunculagine) ce qui lui confère un gout âcre et amères.

Cette partie récapitule les caractéristiques physico-chimiques, l'activité antioxydant, le profile phénoliques de l'extrait aqueux, l'extrait étheré et les propriétés fonctionnelles et biologiques de la poudre de l'écorce de grenade (PEG) de Bordj Menail (Algérie).

L'organigramme suivant résume les différentes étapes pour l'obtention de la poudre d'écorce de grenade et les méthodes de caractérisation.

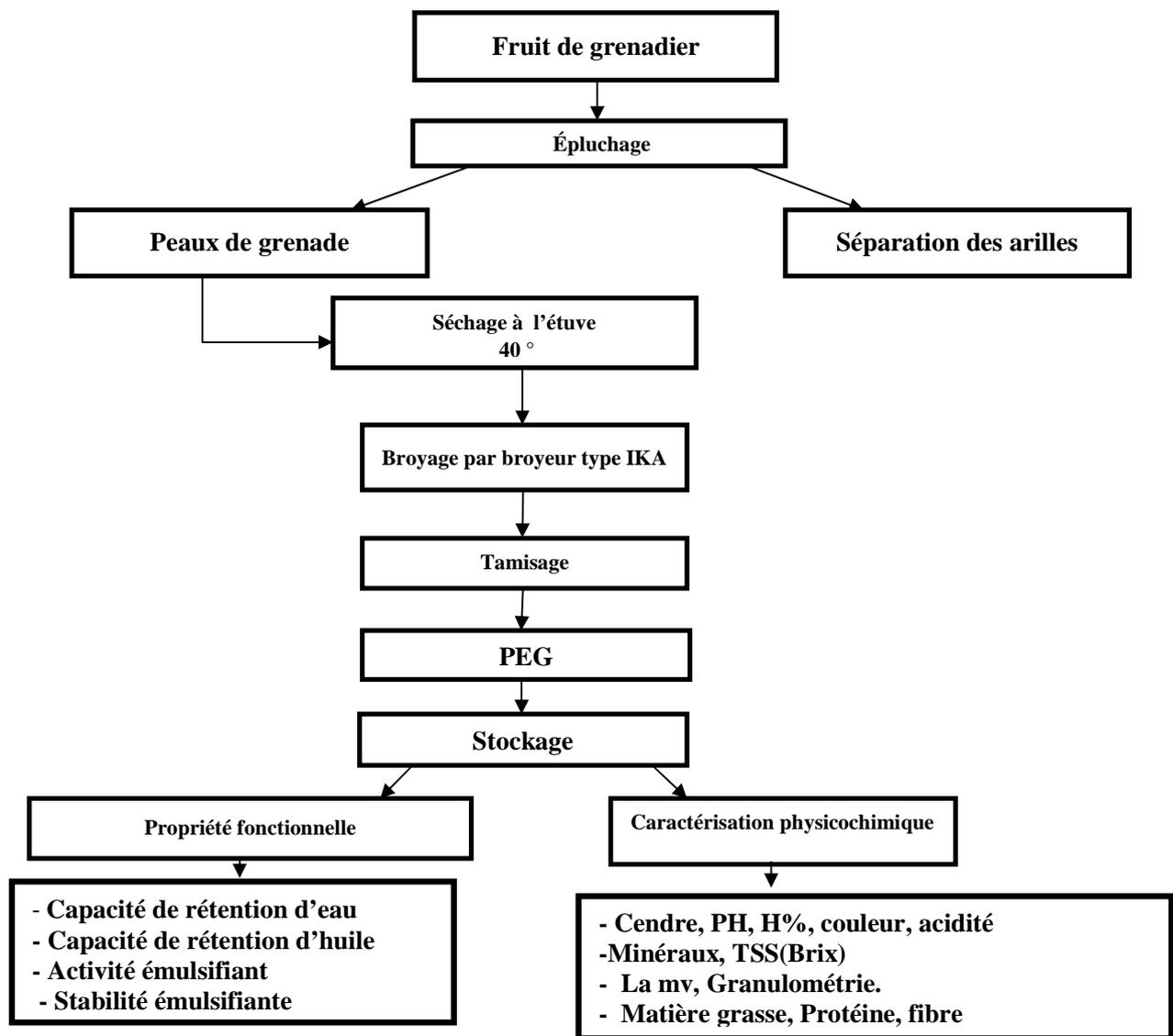


Figure 3 : Obtention et caractérisation de PEG.

Les extraits de l'écorce de grenade sont obtenus à partir de trois solvants différents (Méthanol, Eau, diéthyléther), permettant d'isoler les divers principes actifs de ce fruit (tanins, composés phénoliques, alcaloïdes).

La figure 4 récapitule les principales étapes pour l'obtention de l'extrait aqueux (EAPEG) et de l'extrait éthéré (EEPEG) de la poudre d'écorce de grenade.

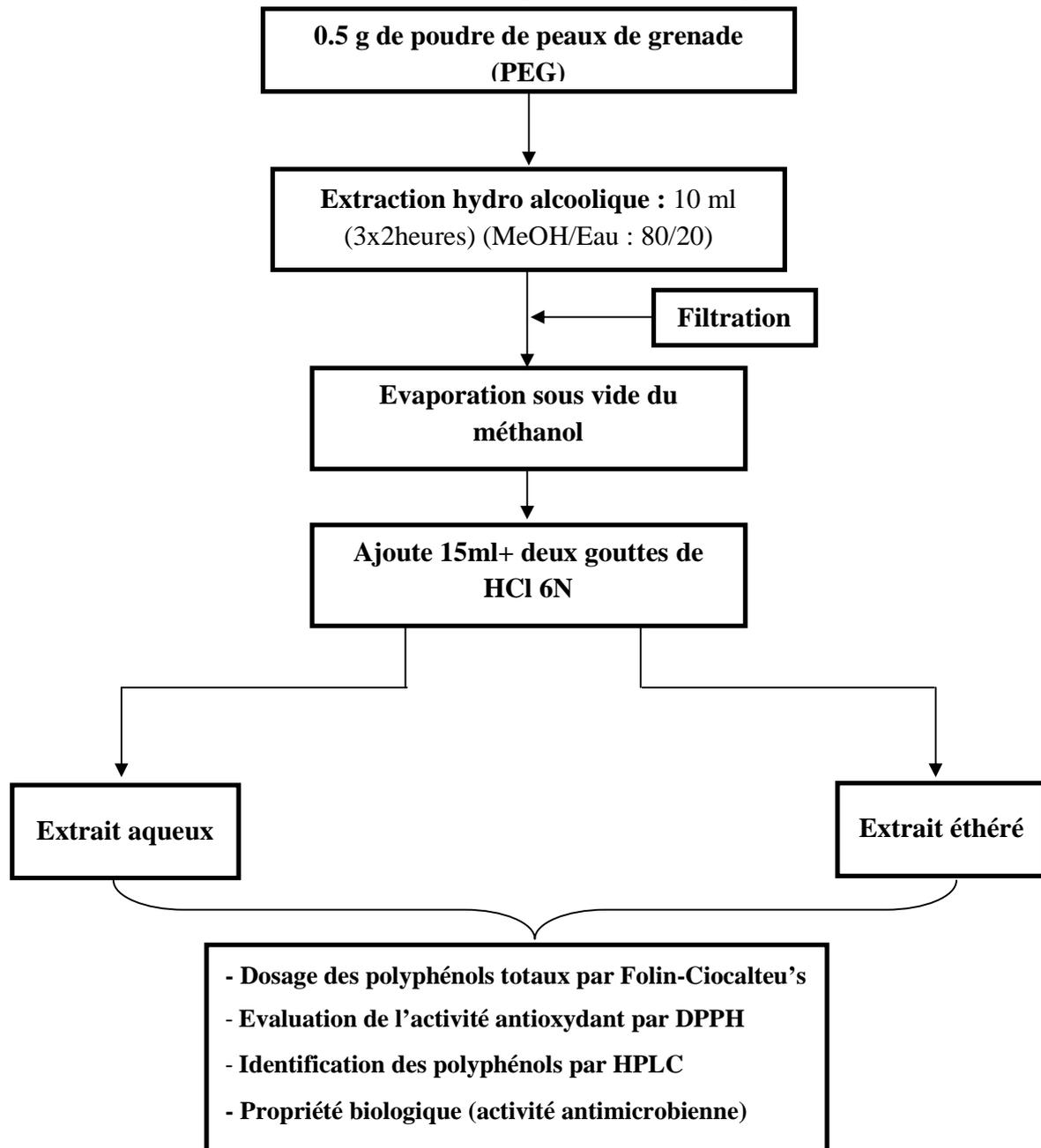


Figure 4 : Principales étapes pour l'obtention de l'extrait aqueux (EAPEG) et de l'extrait éthéré (EEPEG) de la poudre d'écorce de grenade.

I.6.1.Méthode de dosage et identification des polyphénols de PEG

a- Screening chimique

La caractérisation des substances chimiques bioactives met en œuvre des réactions de précipitation ou de coloration pour l'identification des différentes substances chimiques (Flavonoïdes, saponosides, Tannins (totaux, catéchétiques, galliques, Anthocyanes) existantes dans la PEG.

Les tests relatifs à ce screening chimique sont réalisés sur la poudre (PEG) (cas des alcaloïdes), l'EAPEG et EEPEG (cas des flavonoïdes, des tannins : totaux, catéchétique et gallique, des saponosides et des anthocyanes).

Identification des flavonoïdes, à 5 ml de l'EAPEG et EEPEG sont additionnés, 5 ml d'HCl, un coupeau de Mg et 1 ml d'alcool iso amylique. L'apparition d'une coloration rouge orangée indique la présence des flavonoïdes.

Identification des tannins, à 5 ml de l'EAPEG et EEPEG sont ajoutées quelques gouttes d'une solution $FeCl_3$ à 5 % .la réaction donne une coloration bleue noire en présence des tannins.

Identification des tannins galliques, a 5 ml de l'EAPEG et EEPEG sont ajoutés 2 g d'acétate de sodium et quelques gouttes de $FeCl_3$.La réaction donne une coloration bleue foncée en présence des tannins galliques.

Identification des saponosides, Introduction de 5 ml d'HCl à 0,1 N (fiolle 1) et 5 ml de NaOH à 0,1 N (fiolle 2). L'apparition d'une mousse dans l'une des fioles après l'ajout de 2 à 3 gouttes de l'EAPEG et EEPEG, indique la présence des saponosides.

Identification des anthocyanes, on ajoute quelques gouttes d'ammoniaque, à 5 ml de l'EAPEG et EEPEG. La réaction donne une coloration rouge en présence d'anthocyanes.

b- Dosage des polyphénols totaux

- Extraction des polyphénols

Le solvant utilisé dans notre étude est le méthanol à 80%, celui-ci possède l'avantage d'être éliminé facilement sous vide. Il donne en plus un meilleur rendement d'extraction dépassant celui de l'eau. Pour cela, on introduit 0,5 g de PEG dans un bécher avec (10 x 3) ml du

méthanol à 80%. Après une macération de deux heures, les trois filtrats sont récupérés dans ballon de 250ml. Le méthanol est évaporé sous pression réduite, ensuite on ajoute deux gouttes de HCl (6N). La solution résultante est extraite avec par le diéthyléther (3 x 5 ml). Après agitation la phase aqueuse est ajustée à 10ml(EAPEG). La phase étherée est filtrée par le sulfate de sodium. Le diéthyléther est évaporé sous vide, le résidu ainsi obtenu est récupéré dans 5 ml de méthanol(EEPEG) (Viuda-Martos M, 2012).

- Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols de EAPEG et EEPEG a été effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu's. Pour cela, à 0.5 ml de EAPEG dilué 100 fois, et EEPEG dilué 25 fois, on ajoute successivement 2,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu's et 2 ml de carbonate de sodium à 20 %. Après incubation dans un bain marie pendant 5 min à 50 °C, la lecture des absorbance est effectuée à 760 nm. La concentration en composés phénoliques totaux (équivalent acide gallique EAG) est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.(Viuda-MartosM, 2012)

c- Dosage des anthocyanes totaux

La composition en anthocyanine totaux (ACT) est estimée par la méthode du pH différentielle en utilisant deux tampons : tampon chlorure de potassium à pH 1,0 et le tampon acétate de sodium à pH 4,5 .Pour cela, 0,4 ml EAPEG et EEPEG est mélangé séparément avec 3,6 ml de chacun des deux tampons, ensuite l'absorbance est mesuré à 510 nm et 700 nm, (Yves-Alain B,2011).

Puis l'absorbance Abs est calculée comme suit :

$$\text{Abs} = (\text{Abs}_{510} - \text{Abs}_{700})_{\text{pH}1.0} - (\text{Abs}_{510} - \text{Abs}_{700})_{\text{pH}4.5}$$

Les anthocyanes totaux (exprimées en mg de cyanidine-3- glucoside/100ml d'extrait) sont calculés selon l'équation suivante :

$$\text{Anthocyanes Totaux} = (\text{Abs} * \text{PM} * \text{FD} * 100) / \text{CAM}$$

Soit : *Abs* Absorbance, *PM* Poids moléculaire (449,2), *FD* Facteur de dilution (20), *CAM* Coefficient d'absorption molaire de Cyanidine-3-glucoside (26.900).

d- Dosage des flavonoïdes

La teneur totale en flavonoïdes d'EAPEG et EEPEG est déterminée par spectrophotométrie selon la méthode de (Yves-Alain B, 2011) Pour cela, à 1ml de EAPEG et EEPEG est dilué séparément, on ajoute 1ml d'une solution méthanolique contenant 2% de chlorure d'aluminium. Après incubation à température ambiante pendant 15 minutes, l'absorbance du mélange réactionnel est mesurée à 430 nm avec un spectrophotomètre type PERKI IV ELMER.

La concentration en flavonoïdes (équivalent Quercitain) est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de la Quercitain.

e- Identification et quantification des composés phénoliques de PEG par HPLC

Les analyses HPLC sont réalisées sur une chaîne HPLC de marque Agiles (HP 1100 Waldbronn, Allemagne) équipée d'un système de dégazage, d'une pompe quaternaire, d'un système d'injection automatique thermostat et d'un détecteur à barrettes de diodes.

Les composés phénoliques sont séparés en appliquant un gradient d'élution sur une colonne en phase inverse Nucleodur® C18 Gravity (250 x 4,6 mm, ayant des particules de 5µm et des pores de 110 Å) (Macherey Nagel, Allemagne), thermo statée à 30°C. Les solvants (A) et (B) correspondent respectivement aux solutions eau/acide formique 95/5 (v/v) et acétonitrile/eau/acide formique 80/15/5 (v/v/v). L'EAPEG et L'EEPEG sont filtrés à l'aide d'un filtre PTFE 0,45µm, ensuite 10 µL de chaque extrait est injecté et l'élution des composés phénoliques se fait pendant 90 min après application du gradient présenté dans le Tableau 5

La figure 5 et 6 représente le profil phénolique de l'extrait aqueux (A) et l'extrait étheré (B) de la poudre d'écorce de grenade.

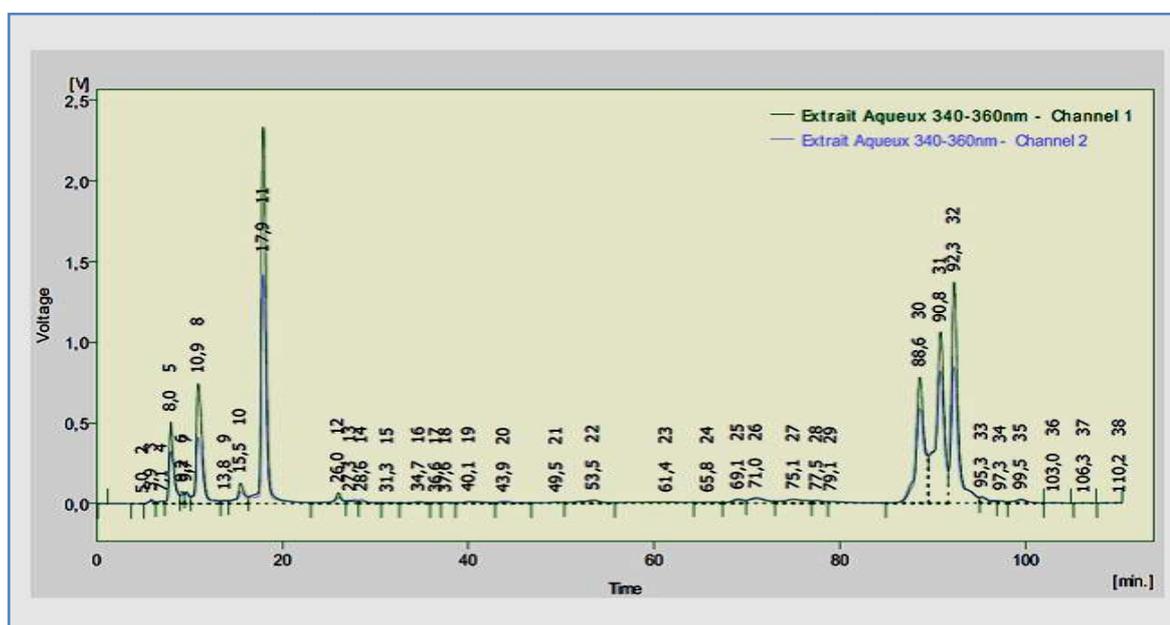


Figure 5 : Chromatogramme des composés phénoliques de l'EAPPG (340 – 360 nm).

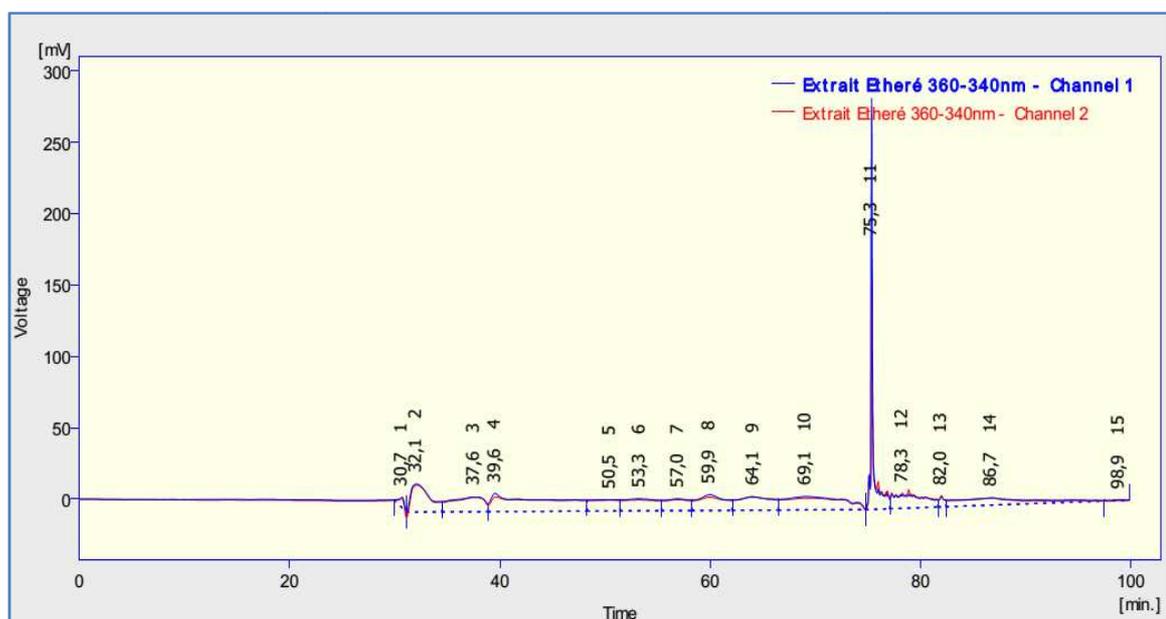


Figure 6:Chromatogramme des composés phénoliques de l'EEPPG (340– 360 nm)

Tableau 5: Gradient d'élution des composés phénoliques par HPLC.

Temps en minutes	% solvant B	% solvant A
0	3	97
19	4	96
30	4	96
31	6	94
38	14	86
50	14	86
55	30	70
65	35	65
68	50	50
70	80	20
75	80	20
80	3	97

I.6.2. Evaluation de l'activité antioxydant des extraits de PEG par la méthode de DPPH

Pour l'évaluation de l'activité antioxydant, on mesure le pourcentage du DPPH restant à l'équilibre (DPPH)_R (%), ensuite on détermine la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % de DPPH• (EC50) et le temps équivalent EC50.

La solution de DPPH• à 63.4 µM (25 mg dans 100 ml de méthanol 90%) est préparée à l'avance (au moins 1-2 heures) car la solubilisation est difficile. A partir de l'EAPEG et l'EEPEG, cinq concentrations ont été préparés, ensuite 0.1 ml de chaque solution est mélangé avec 3.9 ml de la solution du DPPH• (Absorbance de 0.68 ± 0.03 à 515 nm).

Le mélange réactionnel est agité vigoureusement pendant 10 secondes. Le contenu est ensuite transféré dans un micro-tube de 4 ml et puis incubé dans la cavité du spectrophotomètre pendant 30 mn. L'absorbance à 515 nm a été mesurée chaque 5 minutes (contre le méthanol) par un spectrophotomètre (SHIMADZU UV-VIS 1800, Japan). Le BHT est utilisé comme antioxydant de référence dans l'évaluation de l'activité antioxydant. Pour cela cinq solutions de

BHT ont été préparés ensuite 0.1 ml de chaque solution est mélangé avec 3.9 ml de la solution du DPPH•, l'absorbance à 515 nm a été mesurée par un spectrophotomètre UV-VIS.

La courbe d'étalonnage du DPPH : est obtenue à partir de cinq solutions du DPPH•, avec des concentrations varient entre 3.37 et 63.4 μM (15-250 $\mu\text{g/ml}$). La réduction des radicaux libres est évaluée par le rapport relatif de la concentration résiduelle $[\text{DPPH}\bullet]_{\text{R } t=30\text{mn}}$ par rapport à sa concentration initiale :

$$\%(\text{DPPH})_{\text{R}} = \frac{[\text{DPPH}]_{t = \text{teq}}}{[\text{DPPH}]_{t = 0}}$$

Pour s'affranchir de l'influence de la concentration, la réactivité est estimée par la concentration effective CE 50 de l'antioxydant, qui correspond à une réduction de 50% de l'activité (de l'absorbance) du DPPH• dans le milieu réactionnel (Cristina p, 2009).

I.6.3. Activité antibactérienne de la PEG

- Microorganismes utilisés et conditions de culture

La méthode utilisée pour mesurer l'activité antibactérienne de l'EAPEG et l'EEPEG est celle d'Akbi (2011), avec quelques modifications.

Les microorganismes utilisés pour l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'EAPEG et l'EEPEG sont l'*Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus* et *pseudomonaceveulgarus*, inclinées dans une gélose nutritive. Les souches bactériennes sont conservées à 5°C.

A partir des trois souches bactériennes, on réalise des repiquages sur gélose nutritive dans des tubes à essai. Les tubes sont incubés dans l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 h.

La suspension bactérienne est préparée par l'eau physiologique, en diluant une petite quantité de la souche bactérienne afin d'obtenir l'*inoculum*.

Pour que le dénombrement de bactéries survivantes soit précis, on utilise la méthode de spectrophotométrie à la longueur d'onde de 620 nm. Une absorbance qui varie entre 0,15 à 0,25 correspond à une concentration de 10^6 à 10^8 cellules par millilitre d'inoculum.

NB : La concentration 10^6 à 10^8 cellules par millilitre permet d'obtenir des tapis de colonies confluentes suffisamment denses.

Deux dilutions de chaque souche bactérienne sont réalisées, avec un facteur de dilution : 10 et 100 fois.

- **Evaluation de l'activité antibactérienne des EAPEG et EEPEG par la méthode des puits**

0,5 ml de l'inoculum est ensemencé sur le milieu de Muller Hinton (ensemencement en nappe) dans des boîtes de Pétri préalablement préparées. Le surplus d'eau est évaporé à l'air libre. La manipulation se fait dans la zone stérile (près du bec bunsen), jusqu'à ce que le milieu soit sec. Ensuite, on réalise des puits (des creuses à l'aide d'une pipette pasteur de 4 mm). Les puits sont remplis avec 0.1 ml de l'EAPEG et l'EEPEG. Les boîtes sont placées à 4°C pendant 2h. Après solidification les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h.

L'activité antibactérienne est exprimée par le diamètre de la zone d'inhibition (Duraffourd, 1990) :

- les souches résistantes sont celles ayant un diamètre : $d < 10\text{mm}$

- les souches sensibles sont celles ayant un diamètre : $10\text{ mm} < d > 14\text{ mm}$

- les souches très sensibles sont celles ayant un diamètre : $15\text{ mm} < d > 19\text{ mm}$

- les souches extrêmement sensibles sont celles ayant un diamètre $d > 20\text{ mm}$.

Les résultats de la cratérisation physicochimiques et biologiques des extraits aqueux et éthéré sont résumés dans la partie suivante.

I.6.4. Caractéristiques physicochimique et biologiques de la poudre de l'écorce de grenade (PEG)

I.6.4.1. Caractéristiques physicochimiques

Le tableau 6 résume les principales caractéristiques physicochimiques de PEG

Tableau 6 : Caractéristiques physicochimiques de PEG

Paramètres		Valeurs
Teneur en eau (g/100g)		8.83
pH		4.40
Teneurs en cendres %		10.00
TSS %		41.62
Acidité %		4
Protéines		7.00
Fibres		26.00
Lipides		0.60
Couleur	<i>A</i>	-0.23
	<i>B</i>	25.23
	<i>C</i>	25.20
	<i>H</i>	89.93
	<i>L</i>	77.5
Minéraux (mg/100g)	Cu	0.0
	Na	1.7781
	K	5.7142
	Mg	3.9575

Le PEG présente une teneur en eau de 8,83% ce qui faciliter le stockage en ralentissant les réactions d'altération et de prolifération des microorganismes en particulier les moisissures durant le stockage et le transport.

La poudre d'écorce de grenade présente un pH acide, cette acidité est expliquée par sa richesse en acides organiques principalement l'acide hydroxybenzoïque, l'acide gallique, l'acide éllagique et l'acide punicalagin.

La PEG constitue une source importante en fibre et minéraux.

La couleur est l'un des paramètres les plus importants pour l'évaluation de la qualité des produits alimentaires car elle influence l'acceptabilité pour le consommateur (40% du critère d'acceptabilité) cela est dû à des nombreux facteurs : la variété, l'état de maturité des fruits et le procédé de séchage. La préservation de la couleur originale de PEG nécessite des prétraitements (avec les sels) avant le séchage.

I.6.4.2. Caractéristiques biologiques

➤ L'activité antibactérienne de l'EAPEG et l'EEPEG

Le tableau 7 récapitule les résultats de l'activité antibactérienne de l'EAPEG et l'EEPEG.

Tableau 7: Activité antibactérienne de l'EAPPG et l'EEPPG.

Extraits Souches	Diamètres des zones d'inhibition (mm)					
	EAPPG			EEPPG		
	Pur	10 ⁻¹	10 ⁻²	Pur	10 ⁻¹	10 ⁻²
<i>Staphylococcus Aureus</i>	15	18	26	0	0	0
<i>Escherichia. Coli</i>	14	16	18	0	0	0
<i>PseudomonaceVulgareuce</i>	20	21	23	0	0	0

Le pouvoir antibactérien de l'EAPEG et l'EEEG est obtenu par la mesure du diamètre de zone d'inhibition. Les résultats obtenus (tableau 7) montrent que l'EAPEG inhibe la

croissance de trois bactéries, il s'agit de la *Pseudomonaceveulgarus*, la *Staphylococcus aureus* et l'*Escherichia coli*. Cet effet inhibiteur est plus remarqué avec la *Pseudomenace veulgarus* avec l'extrait pur (20). L'effet inhibiteur est très un portant avec les staphylococcus aureus à faible concentration(26), donc l'EAPEG exerce une activité antibactérienne sur les bactéries Gram négatif et les bactéries Gram positif. L'*Escherichia coli* est la bactérie la moins sensible à l'EAPEG, L'EEPEG ne présente aucune activité inhibitrice sur les trois souches étudiées. Donc, on peut dire que l'activité antibactérienne est dû aux molécules bioactives présentent dans l'EAPEG principalement les flavonoïdes les anthocyanes et les acides phénoliques.

➤ L'activité antioxydant

La figure 7 présente la courbe d'étalonnage du DPPH

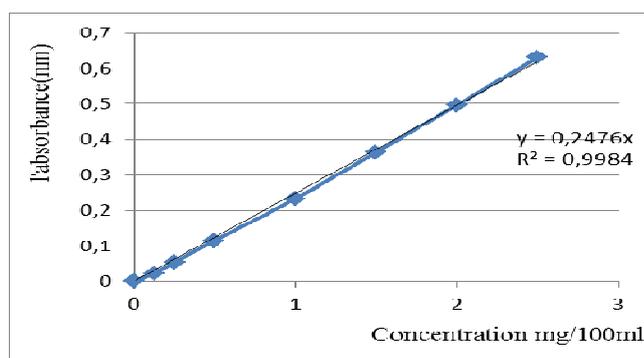


Figure 7 : la courbe d'étalonnage du DPPH

D'après la figure 7, Il n'y a pas de différence significative dans l'absorbance pour les concentrations testées, et une bonne linéarité concentration-absorbance, cela explique la stabilité du DPPH pendant l'analyse. Ce résultat est confirmé dans des études précédentes qui ont rapporté que l'absorbance du DPPH[•] a 515 nm dans du méthanol a diminué avec 20% pour 120 min à 25°C et sous l'action de la lumière, pourtant, à l'obscurité, il n'a pas été observé un changement significatif pendant 150 min.

La réduction des radicaux libres est évaluée par le rapport relatif de la concentration résiduelle $[DPPH\bullet]_{t=Teq}$ restant en fin de cinétique par rapport à sa concentration initiale. L'indice $\%(DPPH\bullet)_R$ diminue jusqu'à atteindre un plateau, cette cinétique variant selon l'antioxydant utilisé.

Tableau 8:Caractérisations de l'EAPEG ; l'EEPEG et du BHT.

	EC50	TEC50 (min)
EA	0.01	3.95
EE	0.12	4.07
BHT	0.61	14.62

Le calcul de l'EC50 et du T_{EC50} (tableau 8) a montré une proportionnalité positive entre ces deux paramètres. L'EAPEG présente une capacité et une efficacité de neutralisation du DPPH très élevée par rapport à celle de l'EEPEG et du BHT, cela explique son activité antiradicalaire qui est peut **l'activité** être dû à la qualité et la quantité des antioxydants de l'EAPEG.

I.6.4.3. Teneur en phénolique

Le tableau 9 récapitule les résultats screening chimique de PEG

Tableau 9 : Résultat du screening chimique de PPG

Les composés identifiés	PPG
Les flavonoïdes	++
Les tannins	+++
Les tannins galliques	++
Les saponosides	--
Les anthocyanes	+++

(+++): Forte teneur ; (++) : teneur moyenne ; (+): Faible teneur ; (-) : Absence

Le tableau 9 montre que la PEG présente une forte concentration en anthocyanes et en tanins et des teneurs moyens en flavonoïdes et tanins galliques.

CHAPITRE II

SYNTHESE DES TRAVAUX SUR LA VALORISATION DE LA POUDRE DE D'ECORCE DE GRENADE

II.1. introduction

Le grenadier fait partie des espèces médicinales (Mars 1999), le fruit du grenadier, feuille, écorce et graines est riche en composés phénoliques (Fournier, 1948). (Afaq, 2005), cette composition lui a attribuée plusieurs propriétés aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine agro-alimentaire, en effet des études ont confirmé que la grenade possède des propriétés antidiabétiques (Jafri, 2000), antimicrobiennes (Braga 2005) et anticarcinogènes (Malik, 2005), d'autres études ont montré que la grenade possède des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes contre la détérioration des produits alimentaires (Navarro-Marts, 2001), (di silvestro, 2009), cela justifie son utilisation comme agent de conservation naturelle car actuellement, il y a tendance à substituer les agents chimiques et synthétiques utilisés en industrie alimentaire par des biomolécules présentes dans les fruits, légumes et les herbes aromatiques (Ayala-Zavala 2005) ayant une activité antimicrobienne et antioxydante.

Dans ce qui suit on présente une synthèse bibliographique sur les travaux d'enrichissement par la poudre des écorces de grenade réalisés au niveau de l'université de Boumerdes.

II.2. Micro-encapsulation de la poudre de l'écorce de grenade

La micro-encapsulation est une technique de protection de matières sensibles (à l'état solide, liquide ou gazeux) appelées aussi matières actives à l'aide d'une matière enrobante par formation de particules de taille micrométrique (Augustin, 2009). Ce procédé permet de créer une barrière de protection pour les molécules encapsulées et de contrôler leur relargage dans un milieu donné. Le contenu d'une capsule individualisée est protégé de l'environnement par la matière enrobante et peut être libéré sous l'action de la température, d'enzymes, du changement de pH du milieu, de l'action mécanique ou simplement par la diffusion à travers la matière enrobante poreuse.

Les microparticules obtenues par ces techniques peuvent se présenter sous deux morphologies distinctes :

- Les microsphères qui sont des particules constituées d'un réseau moléculaire ou lipidique continu formant une matrice dans laquelle se trouve finement dispersée la matière active. Cette dernière peut se présenter sous forme de fines particules solides ou encore de gouttelettes de solutions.

- Les microcapsules qui sont des particules réservoirs constituées d'un cœur de matière active liquide ou solide, entourées d'une enveloppe solide continue de matériau enrobant (Richard et Benoit, 2000).

Ces deux types de morphologie de microparticules sont représentés sur la Figure 7.

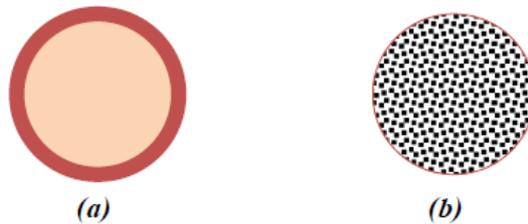


Figure 8: Morphologie de particules obtenues par micro-encapsulation
(a) microcapsule simple, (b) microsphère simple (Richard et Benoit, 2000).

Parmi les techniques d'encapsulation utilisées dans les industries alimentaires on cite la coacervation, la gélification, atomisation, lyophilisation qui se base sur l'interaction entre différents matériaux.

Parmi les matériaux les plus utilisés en micro encapsulation dans le domaine agro-alimentaire sont :

- Les polysaccharides, l'amidon et ses dérivés-amylase, amylopectine, dextrine, maltodextrines, polydextrose, la cellulose et ses dérivés sont communément utilisés. L'enrobage des ingrédients alimentaires hydrosolubles dans les aliments acides.
- Les extraits de plantes-gomme Arabe, gumkaraya, galactomananes et pectines sont également utilisés occasionnellement, les extraits marins comme la carragénane et l'alginate sont aussi utilisés dans les aliments.
- Les protéines sont appropriées pour l'encapsulation, tel que la caséine et les protéines de lactosérum, la gélatine et le gluten.
- Les lipides sont convenables aux applications alimentaires, il y a les acides gras, les cires (cire d'abeilles), les glycérides et les phospholipides (Abdelilah, 2016).

II.2.1. Elaboration des micros capsules par un mélange pectine caséine

Selon (Cucheval, 2009) et (Marcela, 2012) le complexe (pectine-caséine) peut être un bio polymère de choix pour la micro-encapsulation en agroalimentaire vu sa biodégradabilité ainsi que son innocuité. La formation de complexe se fait grâce aux interactions ioniques entre le polysaccharide (la pectine) chargé positivement et la protéine (caséine) chargée négativement à un pH inférieur à son pH isoélectrique.

- Les pectines sont des extraites des plantes (pépins des tomates, écorces d'agrumes et betteraves, pulpes de pommes) (Ridley, 2001). Elles représentent des structures variées. Leur structure primaire a été élucidée dans les années 1920 (Grrigs et Johnstin, 1926). Les pectines sont des polymères composés de plusieurs chaînes d'acide galacturonique (AG), voir Figure 3, ramifiés en position α -(1-4) (Thakur, 1997). Elles sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire pour leurs propriétés gélifiantes dans des produits tels que les confitures et les gelées et pour leur capacité à stabiliser les produits laitiers acides. Leur caractère anionique leur permettrait des interactions avec les protéines (Voragem, 1995 ; Tolstoguzov, 1991).

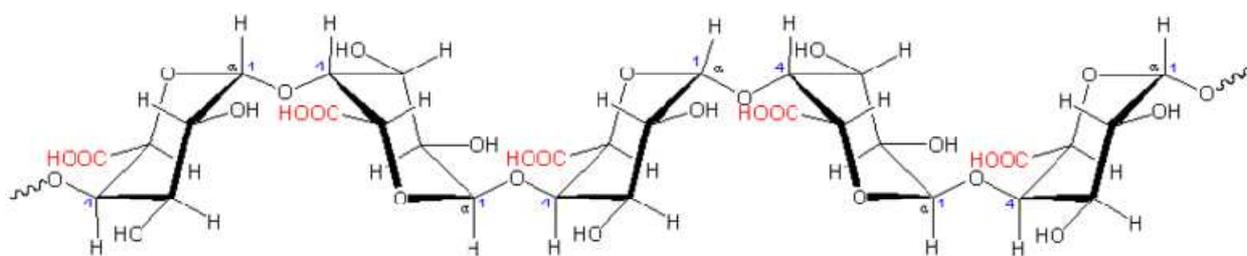


Figure 9: Structure de l'acide polygalacturonique des pectines.

La caséine, Est un polypeptide complexe, résultat de la polycondensation de différents aminoacides, dont les principaux sont la leucine, la proline, l'acide glutamique et la sérine (Jean et Dijon, 1993). Les caséines se distinguent par leur faible solubilité à pH 4,6 (par acidification ou après l'action de la chymosine), elles sont différenciées sur la base de la distribution des charges et de la sensibilité à la précipitation par le calcium (Jelenet Rrtray, 1995). Elle correspond à une fraction micellaire qui représente près de 80% des protéines du lait. Les micelles sont chargées et les fortes répulsions électrostatiques empêchent leur rapprochement (Jean et Dijon, 1993)

Le travail qui a été muni par BENYAHIA Hadjer et HADBI Fahima (2015) montre la passibilité de masquer le goût d'astringence de la PEG par micro-encapsulation, ce qui facilite de ce fait son incorporation dans les formulations alimentaires.

II.2.2. Procède de préparation des microcapsules à base de PEG

➤ Préparation de la PEG

Une fois les fruits lavés et pelés, les graines sont séparées manuellement de l'écorce, ensuite, l'écorce est séchée à 40°C dans une étuve de type MAMMERT. Après broyage, la poudre de l'écorce de grenade (PEG) obtenue est stockée dans des boites hermétiquement fermées à l'abri de la lumière.

➤ Préparation des microcapsules

La PEG retenue pour l'encapsulation est la fraction granulométrique de diamètre < 200µm. La pectine et la caséine utilisée dans ce travail ont été fournier par des industriels.

la technique utilisée est une coacervation complexe, qui est couramment utilisée en industrie, alimentaire, pharmaceutique et cosmétique, et qui se base sur l'interaction entre différents polymères de charge opposée formant ainsi des complexes insolubles (Izabela, 2010). Le Tableau 10 suivant représente les doses des composés utilisées pour la préparation des microcapsules.

Tableau 10 : composition des microcapsules.

Composition	CV (0 ; 1)	PEGE (1 ; 1)	PEGE (1 ; 2)
Eau	100ml	100ml	100ml
Pectine	02g	02g	02g
Caséine	08g	08g	08g
PEG	00	10g	05g

L'organigramme (figure 10) montre les étapes de la préparation des microcapsules.

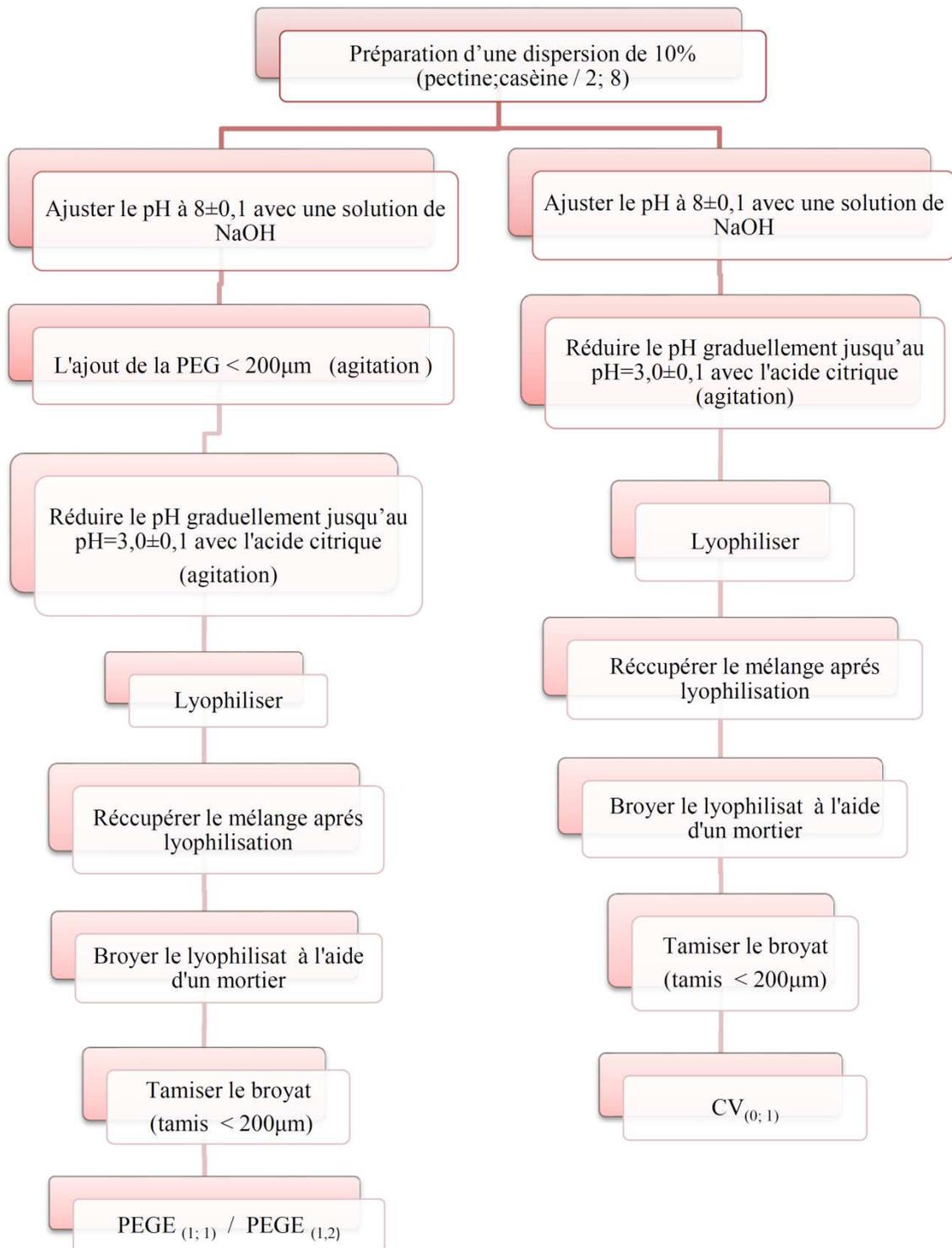


Figure10 : les étapes de la préparation des microcapsules

II.3. Incorporation de la PEG micro-encapsule dans le yaourt

Pour évaluer l'efficacité de la micro-encapsulation et la stabilité des microcapsules, ils ont été incorporés dans le yaourt étuvé et brassé. Pour cela, elles ont suivi le protocole opératoire suivant :

II.3.1. Préparation

La poudre de grenade PEG et les microcapsules $PEGE_{(1,1)}$, $PEGE_{(1,2)}$ ainsi que le mélange CV(0,1) pectine – caséine ont été incorporés dans une matrice alimentaire qui s'agit d'un yaourt étuvé dans le but de l'enrichir en biomolécule.

Le yaourt a été élaboré selon le protocole récapitulé dans la figure 9. Pour cela, nous avons utilisé un lait reconstitué : une poudre de lait dans du l'eau minérale, remuer pour homogénéiser à l'aide d'une cuillère, le lait est standardisé à 140g de matière sèche par litre du lait. Ensuite le lait a été pasteurisé à 85°C pendant 5 minutes. Après refroidissement jusqu'à une température de 45°C, l'inoculation est faite par l'ajout du levain lactique préalablement préparé (0.56 g de mélange des ferments « *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* » dans 1000ml du lait 0% de matière grasse).

II.3.2. Résultats

Le tableau suivant récapitule les principaux résultats de l'incorporation de micro capsule de la PEG dans le yaourt.

Le tableau11 : Résultats préliminaires d'essai d'incorporation dans un yaourt étuvé.

	Doses	Formation de coagulum	Synérèse	Couleur	L'astringence	Dépôt
Témoin blanc	-	Bon	Absence	blanc	-	Absence
PEG	1,5%	Bon	Absence	Jaune vert	Apparente	Présence
	02 %	Bon	Absence	Jaune vert	Apparente	Présence
	2,5%	Bon	Absence	Jaune vert	Apparente	Présence
PEGE (1 ; 1)	1,5%	Mauvais	présence	crème	Partiellement masqué	Absence
	02%	Mauvais	présence	crème	Partiellement masqué	Absence
	2,5%	Mauvais	présence	crème	Partiellement masqué	Absenc
PEGE (1 ; 2)	1,5%	Mauvais	présence	Crème	Masqué	Absence
	02%	Mauvais	présence	Crème	Masqué	Absence
	2,5%	Mauvais	présence	Crème	Masqué	Absence
CV (0 ; 1)	02%	Mauvais	présence	Blanc	-	Absence
	2,5%	Mauvais	présence	Blanc	-	Absence

II.3.3. Conclusion :

Les résultats préliminaires d'essai d'incorporation dans un yaourt étuvé ont montré que :

- Le yaourt témoin présente un bon coagulum ce qui indique une bonne fermentation.
- Le yaourt avec la PEG présente une couleur jaune vert typique de la couleur de la PEG, avec une astringence intense due à sa richesse en tanins, pour toutes les concentrations. Ceci revient à la diffusion des composants de la poudre dans le milieu. Le coagulum présente un aspect ferme, ce qui nous permet de conclure que les ferments lactiques résistent à l'activité antimicrobienne de l'écorce de grenade. Néanmoins, on constate un dépôt de la PEG.
- L'incorporation de la PEGE (1 ; 1) affecte la formation du coagulum. Lors de l'ajout de la PEGE on a constaté la formation de flocons (précipitation précoce des caséines du lait avant même l'action des ferments lactiques) qui sont probablement dus à l'acidité des capsules, donnant de ce fait une séparation du lactosérum et un coagulum lâche et mou. En effet, cette acidification est due au complexe (caséine-pectine) qui est formé par coacervation ce qui nécessite un abaissement graduel du pH jusqu'au pH= 3, sans pour autant l'existence de possibilités de lavage des capsules formés sans risque d'érosion du complexe.
- L'astringence est partiellement masquée, prouvant la résistance des microcapsules dans le yaourt, ainsi le but principal de cette application a été atteint. Cette dernière a été nettement masquée dans le yaourt avec la PEGE (1 ; 2). L'apparition de la couleur crème peut être due soit à la fraction de la PEG non encapsulée, représentant 8% et 3% pour la PEGE (1 ; 1) et la PEGE (1 ; 2) respectivement, soit à la diffusion des molécules de couleur jaune via les capsules.
- L'absence de dépôt dans le yaourt enrichi avec la PEG est expliqué par l'hydratation de la pectine dans le milieu aqueux et les interactions (pectine - caséine) donnant du corps au mélange, empêchant ainsi la sédimentation des capsules.

II.4. Incorporation de PEG dans le l'ben

Le travail qui a été muni par MEDIANI AMEL et GUERHLI AMINA consiste à élaborer une recette traditionnelle de L'ben de la région de Naama appelé Chboub utiliser pour soigner l'Ulcère acide avec l'incorporation de la poudre de grenade.

La poudre de grenade PEG utilisé est issue de mélange de deux variétés, la variété douce (hloow) et la variété acide (hamed) .l'écorce de grenade a été séchée a l'air libre pendant un mois et broyée a l'aide d'un mixeur et d'un mortier jusqu'à l'obtention d'une poudre. Les caractéristiques de cette poudre PEG est représentées sur le tableau 06 suivant :

Le tableau 12:Les analyses physico chimique de la poudre d'écorce de grenade.

Les caractéristiques physico chimique	Ecorce de grenade
Teneur en eau (%)	9,20±0,58
pH	4,77±0,023
L'acidité titrable	3,36±0,054
Matière organique	89,08±0,025
Teneur en cendre	1,933±0,076
TSS(Brix)	2,5±0,5

L'incorporation de la PEG est faite selon trois formulations :

Formulation A : dans un bécher mettre 2g de PEG ensuite complète avec le l'ben jusqu'à obtention de poids de 100g.

Formulation B : 1,5 de PEG dans 100g de L'ben.

Formulation C : 1gde PEG dans 100g de L'ben.

Les résultats des classements des différents critères étudier ainsi que la somme des rangs par produit et par l'ensemble des sujets ont été déterminé.

Pour l'interprétation des résultats obtenu avon utilisé le teste de Friedman basé sur la calcule de F

Tableau 13: les différents paramètres selon le calcule de F.

Paramètres	Amertume	Astringence	Arrière-gout	Couleur	Texture
F	5,2398	7,533	3,0495	1,4472	4,35
δ	12,478				
A	0,0167				
L	5,99				
Z	2,14				

Conclusion :

D'après le teste de Friedman, on conclut que la formation avec le l'ben C qui contenait une concentration de 1% de poudre d'écorce de grenade est la plus appréciée par les panélistes en tout point de vue.

II.5. L'incorporation de PEG dans Boisson type Bitter.

Le travail qui a été muni par MEDIANI AMEL et GUERHLI AMINA consiste a élaborer trois boissons bitters avec différents degrés d'amertumes, pour ce la elles sont utilisé les ingrédients suivants :

1- Sirop blanc :mélanger 500ml d'eau distillée avec 450g de sucre cristallisée puis ajouter 08 cuillères à café de jus de citron ,porter à l'ébullition pendant une heure.

2- Les extraits d'herbes aromatiques : pour les trois boissons bitter choisie on prépare deux extraits aromatisants à partir des herbes aromatiques sèches.

1^{er} extrait : dans un bécher qui contient 100ml d'eau distillée on ajoute 05g de poudre d'écorce de grenade plus 05g de graines de fenouil plus 05g d'anis étoilée on ports le tous à l'ébullition douce pendant 30min à une température de 90-100°C

2^{eme} extrait : dans un bécher qui contient 100ml d'eau distillée on ajoute 05g de poudre d'écorce de grenade plus 05g de réglisse ,05 g d'anis étoilée, portez ce mélange à l'ébullition pendant 30min à une température de 90°C pour assurer le passage des principes aromatisants dans la phase aqueuse.

3- Sirops de grenadine industrielle : de la marque « El soufra, on utilise ce sirop afin d'avoir l'arôme de grenade ainsi que l'amélioration de la couleur de la boisson.

A partir de ces ingrédients on prépare 03 formulations dans boisson type bitter.

F1 : boisson bitter aromatique par le fenouil et d'anis étoilée

On prend 100ml de sirops blanc en ajoute 68ml de l'extrait de plante aromatique filtré (1^{er} extrait) en suit en ajoute 15ml de sirop de grenadine puis en dilue avec l'eau minérale j'jusqu'a obtention d'un jus à Brix de 12

F2 : boisson bitter aromatique par le (50ml de sirop blanc).

On prend 50ml de sirops blanc en ajoute 70ml de l'extrait de plante aromatique filtré (1^{er} extrait) en suit en ajoute 15ml de sirop de grenadine puis en dilue avec l'eau minérale j'jusqu'aobtention d'un jus à Brix de 11.

F 3: boisson bitter aromatique par le réglisse et l'anis étoilé.

On prend 50ml de sirops blanc en ajoute 78ml de l'extrait de plante aromatique filtré (2^{em} extrait) en suit en ajoute 15ml de sirop de grenadine puis en dilue avec l'eau minérale j'jusqu'a obtention d'un jus à Brix de 11.

✓ Résultats des analyses sensorielles

Les résultats des classements des différents critères étudier ainsi que la somme des rangs par produit et par l'ensemble des sujets ont été déterminé. Pour l'interprétation des résultats obtenus avons utilisé le teste de Friedman basé sur la calcule de F

Tableau 14:les différents paramètres selon le calcule de F.

Paramètres	Amertume	Astringence	Arrière-gout	Couleur	Texture
F	1,401	0,972	6,351	2,91	1,07
δ	11,72				
A	0,0167				
L	5,99				
Z	2,14				

Conclusion :

Le test de Friedman montre que la boisson de la formulation 2 (fenouil et d'anis étoilée) qui est aromatisée avec l'anis étoilée et fenouillet avec 50ml de sirop blanc est le plus apprécié.

II.6. L'incorporation de PEG dans yaourt en poudre

Le yaourt est généralement pauvre en certains composés comme les polyphénols et des antioxydants naturels.

L'industrie de transformation des produits agricoles génère des quantités importantes de sous-produits riches en composés phénoliques, qui constituent une source naturelle d'antioxydants (Balasundram, 2006) ayant des propriétés potentiellement bénéfiques pour la santé.

Parmi ces déchets, l'écorce de grenade connue par son potentiel nutritionnel et ethno pharmacologique (Akhtar, 2014), mais l'astringence est un facteur limitant de son utilisation dans l'industrie alimentaire.

L'ajout de produits sucrés tels que le miel peut masquer le goût astringent de l'écorce de grenade, le miel est connu par ces vertus sur la santé humaine (Mouhoubi-Tafinine, 2016). Dans une étude menée par Chick (2001) et Varga (2006), il a été démontré que l'ajout du miel dans les produits laitiers fermentés comme le yaourt n'a pas d'effet inhibiteur sur les bactéries lactiques.

Pour augmenter la durée de conservation et enrichir le yaourt en polyphénole.

Le travail mené par Abderrezak Kennas montre la possibilité d'élaborer un yaourt en poudre sucré avec du miel et enrichi en PEG source de biomolécule (polyphénole).

La procédure de fabrication du yaourt en poudre est résumée dans les étapes suivantes :

1. Obtention de la matière première

- la poudre de grenade a été obtenue après séchage et broyage, la poudre d'écorce de grenade (PEG) a été conservée dans des sacs hermétiques à froid (4–6C) dans l'obscurité jusqu'à utilisation.
- le miel multiflore a été collecté à Tizi Ouzou et conservé à l'obscurité entre (4–6C)
- Les ferments lactiques utilisés sont de type (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*) sous forme lyophilisée.

2. Préparation du yaourt

Le yaourt brassé a été produit à l'échelle du laboratoire. Le lait reconstitué, pasteurisé, refroidi à 4°C est inoculé avec 3% (p / p) de levain lactique. La fermentation a été réalisée dans un bioréacteur (BIOSTAT, Sartorius Biotech, Allemagne) à 42 C jusqu'à une valeur de pH de 4.4. Ensuite, le coagulum a été cassé et le PEG et le miel ont été ajoutés.

Le tableau suivant montre les différentes formulations de yaourt.

Tableau 15 : les différentes formulations de yaourt

	PEG	miel
Formulation 1	2,5 %	2,5 %
Formulation 2	5 %	2,5 %
Formulation 3	10 %	5 %

Après homogénéisation, le yaourt a été transféré dans des boîtes de Pétri.

3. Lyophilisation

Les boîtes pétri de yaourt de 5 mm d'épaisseur et de diamètre de 90 mm ont été placés pendant une nuit dans un congélateur à 25°C . Lyophilisation a été réalisée dans un appareil de lyophilisation de laboratoire à $51\text{ ans} \pm 3\text{ C}$ et une pression résiduelle de $3 \pm 0,5\text{ Pa}$ qui correspondent à la pression minimale de la chambre à vide atteinte par l'appareil

Les poudres lyophilisées ont été passées à travers un tamis de $500\text{ }\mu\text{m}$ et stocké dans des sacs hermétiques au froid (4 C) dans l'obscurité avant analyses. Les expériences de lyophilisation ont été effectuées en triple.

Conclusion

On peut conclure que la lyophilisation de yaourt aux écorces de grenade et au miel, aux niveaux d'enrichissement testés, est faisable, et le la poudre à des propriétés physico-chimiques et physique acceptables qui pourraient améliorer sa durée de conservation.

Donc, la poudre de yaourt formulée pourrait être considérée comme une poudre fonctionnelle potentielle avec un antioxydant.

CONCLUSION

CONCLUSION

La poudre d'écorce de grenade constitue une source importante de polyphénols ; ces constituants présentent diverses activités biologiques et sont antioxydantes.

La poudre d'écorce de grenade est obtenue par un séchage naturel ou sous vide ce qui permet d'obtenir une poudre stable et facile à conserver.

La caractérisation physico-chimique de la poudre d'écorce de grenade montre que cette dernière est riche en acide pectique et acide ellagique. Sur le plan biologique la poudre d'écorce de grenade est dotée d'une activité antibactérienne et antioxydante.

Vu ces caractéristiques, la poudre d'écorce de grenade s'accommode parfaitement pour l'élaboration des aliments fonctionnels.

Les résultats des études menées ultérieurement montrent la possibilité d'utiliser la PEG dans plusieurs aliments comme le yaourt, le ben et les boissons bitter.

Le facteur limitant de l'utilisation de la poudre d'écorce de grenade est l'astringence et la présence de certains éléments toxiques (Hmide I ,2013).

- Achtiouene, S. et Benamrouche, R. 2015. Contribution à l'évaluation des propriétés physicochimiques, fonctionnelles et biologiques de la poudre de peaux de grenade (*Punica granatum*) d'Algérie (région de Bordj Menail) Mémoire de Master, Département de Technologie Alimentaire, FSI, Université de Boumerdes.
 - Afaq F, (2005). Pomegranate fruit extract modulates UV-B-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and activation of nuclear factor kappa B in normal human epidermal keratinocytes paragraph sign
 - Afaq, F., Saleem, M., Krueger, C.G., Reed, J.D., Mukhtar, H., 2005. Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK & NF-kappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *Int. J. Cancer*. 113(3), 423-433.
 - Akhtar, S., Ismail, T., Fraternali, D., Sestili, P., 2014. Pomegranate peel and peel extracts: chemistry and food features. *Food Chem*. 147, 417–425.
 - Augustin, M.A. and Hemar , Y. 2009. Nano- et micro-structure pour l'encapsulation des ingrédients des aliments. *Chem Soc Rev*, 38, 902-912.
 - BennickA.(2002).Interaction of plant polyphénols with salivary protiens.CriticalReviewsinOralBiology and Medicine, 13(2):184-196.
 - **Bown, D. (1995)** Encyclopedia of Herbs and Their Uses. Dorling Kindersley, London
 - Calin, S.A., et Carboneli, B.A.A. 2005. La grenade cultivées en Espagne Punicalagine anti-oxydante du jus de grenade et de l'extrait de grenade dans les l'aliment fonctionnelle du fruit. Livre. Natural ontioxydant granatum, université Miguel Hernandez (EDS), Murcia Espagne.
 - Cucheval, A. S. B. 2009. investigations sur le comportement des systèmes pectine/ micelle de caséine et leurs analogues. Thèse de Doctorat, Institut des sciences fondamentales, université de Massey, New Zélande.
 - Grrigs, M.A., Johinslin, R. 1926. Préparation et propriétés colloïdales de pectine. *Génie chimique et industrielle*, 18(6),623-625.
 - Hemingway R. W. (1992).Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In: Lplant polyphenols: synthesis, properties, significande. Hemingway R W, Laks P. E. New York.
 - *Hmid I. (2013)*. Contribution à la valorisation alimentaire de la grenade (*Punica granatum L.*) : caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais.Thèse de
-

Doctorat présenté en cotutelle entre l'Université d'Angers (France) et l'Université de Béni Mellal, Maroc. p. 180.

- *Hmid, I. 2014.* Contribution à la valorisation alimentaire de la Grenade marocaine (*Punicagranatum*) : caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leurs jus vrais. Food and nutrition, archives ouvertes de l'université d'Anger.
 - Kim N. D., Mehta R., Yu W., Neeman I., Livney T., Amichay A., Poirier D., Nicholls P., Kirby A., Jiang W., Mansel R., Ramachandran C., Rabi T., Kaplan B. et Lansky E. (2002). Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 71: 203–217.
 - Lansky E. et Newman R. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*.109: 177–206.
 - Malik A., Afaq F., Sarfaraz S., Adhami V. M., Syed D. N. et Mukhtar H. (2005). Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *PNAS*, 102 : 14813–14818.
 - Mars, M., Marrakchi, M. Diversity of pomegranate (*Punica granatum* L.) germplasm in Tunisia. *Genetic Resources and Crop Evolution* 46, 461–467 (1999)
 - Marcela, M., Baracat, A. M., Nakagawa, R. C. , Sandra, R., Georgetti, W.A., Verri Jr., and Osvaldo F. 2012. Préparation et caractérisation des microcapsules basées sur des polymères biodégradable : complexe pectine /caséine pour les systèmes de libération contrôlée des médicaments. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* Vol.13.No.2.
 - Mediani, A. et Guerhli, A. 2015. Essais de caractérisation et d'incorporation des poudre d'écorce de grenade dans une matrice alimentaire type L'ben et boisson bitter. Mémoire de Master, département de technologie alimentaire, FSI, Université de Boumerdes.
 - Meerts I.A.T.M., Verspeek-Rip C.M., Buskens C.A.F., Keizer H.G., Bassaganya-Riera J., Jouni Z.E., Van Huygevoort A.H.B.M., Van Otterdijk F.M. et Van de Waart E.J. (2009). Toxicological evaluation of pomegranate seed oil. *Chemical Toxicology* 47 : 1085– 1092.
 - Okonogi S., Duangrat C., Anuchpreeda S., Tachakittirungrod S. et Chowwanapoonpohn S. (2007). Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chemistry*, 103 : 839–846.
 - Ribéreau-Gayou P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Edition. Dunod. Paris p1-23.
-

- Thakur, B.R., Rakesh, K.S., Handa, K.H. 1997. Chimie et utilisations de la pectine : article de synthèse. Articles de synthèse dans *Sciences des aliments et Nutrition*, 37(1), 47-73.
- Wald E.(2009). Le Grenadier (*Punicagranatum*): Plante historique et évolutions thérapeutiques récentes. Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, Université Henri Poincaré 1.

.