

ROYAUME DU MAROC  
-----  
OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE (19)  
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE  
-----



المملكة المغربية  
-----  
المكتب المغربي  
للملكية الصناعية و التجارية  
-----

## (12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication : **MA 30115 B1** (51) Cl. internationale : **C12M 00/00**

(43) Date de publication :  
**02.01.2009**

---

(21) N° Dépôt :  
**29950**

(22) Date de Dépôt :  
**30.05.2007**

(71) Demandeur(s) :  
**BIOVALOR SARL, KM 14,5 RTE BENSLIMANE TIT MELIL MADIOUNA - B.P.33  
CASABLANCA (MA)**

(72) Inventeur(s) :  
**SANAE MDAGHRI ALAOUI ; FAOUZI ERRACHIDI ; MOHAMMED BENLEMLIH**

(74) Mandataire :  
**AMAL EL ANDROUSSE**

---

(54) Titre : **PROCEDE POUR OBTENIR LES ANTIOXYDANTS TOTAUX A PARTIR DES  
FRUITS OLEAGINEUX ET DE LEURS SOUS PRODUITS : EAUX RESIDUAIRES , ET  
LEURS STABILISATION PAR LA LYOPHILISATION**

(57) Abrégé : L'invention concerne un procédé d'obtention des antioxydants totaux à partir des fruits oléagineux et de leurs sous produits: ainsi que leur stabilisation par la lyophilisation

**Abrégé**

L'invention concerne un procédé d'obtention des antioxydants totaux à partir des fruits oléagineux et de leurs sous produits: ainsi que leur stabilisation par la lyophilisation

30115

2 JAN 2008

**Titre de l'invention** : Procédé pour obtenir les antioxydants totaux à partir des fruits oléagineux et de leurs sous produits : eaux résiduaire et leur stabilisation par la lyophilisation

**Description de l'invention**

L'extraction de l'huile à partir de certains fruits oléagineux tels que l'olive, l'amande ou l'arganier, engendre des rejets considérables d'eaux résiduaire. La majorité de ces fruits oléagineux renferment des substances organiques antioxydantes qui comprennent des composés phénoliques et certaines vitamines telles que le tyrosol, l'hydroxytyrosol, acide caféiques, tocophéroles et autres. Une grande partie des composés hydrophiles, au cours de l'extraction de l'huile désirée se retrouve dans les eaux résiduaire.

L'olivier est une source importante de produits naturels à haute valeur ajoutée pour la région méditerranéenne. Les propriétés antioxydantes des composés phénoliques des olives, particulièrement l'oleuropéine et les produits de son hydrolyse, ont été décrites dans la littérature (**A.Saija et col 1998**). L'oleuropéine est une substance phénolique qui se produit dans les fruits et les feuilles d'olive. Elle est bien connue pour ses effets antimicrobiens (**G.Bisignano et col 1999**), anti-inflammatoires et antioxydantes (**R.W.Owen et col 2000**). L'hydroxytyrosol ((3,4-dihydroxyphenyl)-ethanol), qui est un produit de dégradation d'oleuropéine (**D.Ryan, et col 1999**), montre également des propriétés antioxydantes. L'efficacité antioxydante de l'hydroxytyrosol a été vérifiée (**M.H.Gordon, et col 2001**), elle est plus élevée que celle de l'oleuropéine, le tocophérol et l'acide ascorbique. L'hydroxytyrosol peut être obtenu par l'hydrolyse chimique ou enzymatique de l'oleuropéine (**R.Briante et col 2004**). Les antioxydants agissent en piégeant les radicaux libres de la molécule d'oxygène dans l'organisme humain.

Les fruits d'amandier, d'arganier (**A. Moukal 2004**) et de la plupart d'autres fruits oléagineux sont aussi très réputés par leurs contenances en molécules organiques à activité antioxydante, et dont une grande partie se retrouve dans les eaux résiduaire au cours de l'extraction de l'huile désirée.

La plupart des antioxydants, à bas point de fusion, existant sur le marché sont solubilisés dans un solvant approprié et stockés à une température de - 20°C ce qui influe sur leurs conservation et leur transport.

Aucun des processus connus actuellement ne s'intéresse, à la totalité des composés antioxydants des eaux résiduaire des fruits oléagineux, ni à leur conservation sous forme de poudre lyophilisée, permettant ainsi un meilleur conditionnement et une nette augmentation de leur stabilité. (particulièrement pour les antioxydants avec un point de fusion inférieur à 100°C)

Par conséquent, le premier aspect de la présente invention est le développement d'un procédé simple et rapide pour obtenir un concentrât d'antioxydants naturels issu des eaux résiduaire des fruits oléagineux avec un rendement élevé qui est suivie d'une extraction sélective de chaque composé désiré.

L'utilisation des antioxydants extraits des sous produits de certains fruits oléagineux étant limité par leur courte stabilité, par conséquent le deuxième aspect de cette invention permet l'obtention des composés organiques bio actives sous formes de poudre et particulièrement sous forme de cristaux lyophilisés. Ceci permet également le conditionnement et la conservation à longue durée (3 ans) des antioxydants purs.

Ces antioxydants sont extraits des eaux résiduelles des fruits oléagineux. L'antioxydant majoritaire extrait est l'hydroxytyrosol caractérisé par son bas point de fusion, l'hydroxytyrosol est purifié et conservé sous forme de poudre lyophilisée. Cette forme de conservation est facile à régenter : un meilleur stockage pour une utilisation ultérieure.

La présente invention concerne a) un procédé pour obtenir un extrait riche en antioxydants à partir des fruits oléagineux et leurs sous produits suivie d'une extraction sélective de chaque antioxydant séparément, b) un procédé pour stabiliser, conditionner et conserver les molécules bio actives présentes dans les eaux résiduelles des fruits oléagineux et plus particulièrement les molécules bio actives à activité antioxydante des margines d'olives sous forme de poudre ou de cristaux par l'intermédiaire de la lyophilisation.

Les différentes étapes consistent d'abord à (a) la soumission des eaux résiduelles de l'extraction de l'huile à partir du fruit oléagineux à une extraction des lipides résiduelles qui risquent d'oxyder les molécules bio actives à savoir les composés phénoliques puis une (b) hydrolyse afin d'obtenir une solution aqueuse riche en antioxydants, (c) un traitement par la chitine pour éliminer des composés phénoliques indésirables (d) une évaporation sous vide pour éliminer 50 % d'eau (e) un séchage par atomisation en présence de la gélatine alimentaire puis (f) une extraction sélective du constituant désiré à une concentration élevée (g) une reprise de l'antioxydant extrait dans l'eau pure (h) la soumission du produit ainsi obtenu dans l'eau pure à la lyophilisation lui permettant ainsi une facilité de gestion, de stockage et une durée prolongée de conservation.

De même ce procédé opte à résoudre un problème de l'environnement et crée en même temps des produits à haute valeur ajoutée.

### Détails du procédé

#### 1. Extraction des lipides résiduels :

Les eaux résiduelles des fruits oléagineux détiennent des quantités considérables de lipides. Ces derniers sont responsables de la détérioration des composés organiques bios actives à activité antioxydante, cette détérioration peut être déclenchée par la peroxydation des lipides. Ainsi ce procédé, en premier lieu fait appel aux solvants apolaires (hexane par exemple) pour éliminer tous les lipides résiduels de ces effluents.

#### 2. Hydrolyse :

L'hydrolyse des glucosides des eaux résiduelles y compris l'oleuropéine peut être effectuée soit par un traitement acide ou alcalin. La meilleure hydrolyse a été réalisée aux conditions acides, à une valeur de pH comprise entre 1 et 3. Ainsi, l'acide citrique en poudre est ajouté aux eaux résiduelles, jusqu'à ce que le pH de 1.5 ait été atteint. Ce mélange a été mis dans un bain marie à une température de 25 °C et a été agité par agitateur magnétique à 100 tours/min. Après 24 heures de temps de réaction, l'extrait a été neutralisé par Na OH (10 M) et la totalité des antioxydants a été produite. L'analyse quantitative et qualitative des antioxydants produits a été réalisée par HPLC.

#### 3. Adsorption sur la chitine :

Le traitement acide des eaux résiduelles des fruits oléagineux sans lipides est suivi par l'adsorption de certains composés indésirables sur la chitine pure (0.5%). Ceci a l'avantage principal d'éliminer les polymères indésirables. Ainsi une telle séparation et une purification

sont facilement effectuées. D'autres complexes chitine - lipides résiduels sont éliminés dans cette étape.

#### 4. Séchage :

Pour concentrer le produit, nous avons opté pour éliminer l'eau par le moyen d'évaporation sous vide. Pour augmenter la stabilité des produits antioxydants nous avons fait appel à plusieurs polymères naturels pour évaporer les margines traités sous des conditions rapides et douces. Les meilleurs résultats sont obtenus avec la gélatine alimentaire. Ainsi, on procède à une évaporation sous vide (rota vapeur) à 50°C à une pression de 90 mbar. Après élimination de plus de 50 % d'eau on ajoute la gélatine de 0.5 à 3 % et on procède à une extraction sélective de chaque antioxydant.

#### 5. Extraction sélective :

La poudre (composés antioxydants et gélatine alimentaire) peut subir une extraction sélective, par un solvant selon la formulation, pour extraire l'antioxydant désiré. L'extraction de l'Hydroxytyrosol par exemple a été réalisée par un mélange de solvants (2v/v) d'acétate d'éthyle et d'acétone à raison de deux volumes par volume de margines. L'extraction de l'Hydroxytyrosol montre un degré de concentration de plus de 50% dans l'extrait phénolique (figure 1).

On a passé dans ce procédé d'une extraction liquide-liquide pénible et coûteuse à une extraction solide-liquide plus simple et moins coûteuse. Les résidus solides peuvent subir une deuxième extraction pour extraire d'autres molécules d'intérêt tel que le tyrosol, flavonoides, acide caféique et autres. Les résidus solides constituent encore un réservoir stable d'antioxydants qu'on peut valoriser directement par d'autres extractions ou utiliser directement dans un procédé agroalimentaire. Par exemple, l'ajout de ce dernier dans la margarine peut la conserver à long terme. Les tests préliminaires montrent que les caractères organoleptiques de la margarine se sont parfaitement améliorés.

#### 6. Conservation :

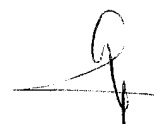
Etant donné que la plus part des antioxydants extraits des fruits oléagineux sont difficiles à stabiliser et principalement les antioxydants avec un bas point de fusion, les extraits des antioxydants les plus importants sont repris dans l'eau puis soumis chacun à une étape de lyophilisation.

La lyophilisation, est une technique naturelle de séchage par le froid et par le vide de produits sensibles. C'est un procédé qui permet de retirer l'eau contenue dans un aliment ou un produit afin de le rendre stable à la température ambiante et ainsi faciliter sa conservation ainsi que son activité biologique

La lyophilisation permet un meilleur conditionnement et une meilleure conservation de chacun des produits désirés. Les extraits sont repris dans l'eau pure à un rapport de 2 à 10 %.

#### Exemple d'application n°1: Amélioration des huiles de table.

L'opération de raffinage, qui comprend la neutralisation, la décoloration et la désodorisation, a pour but de transformer l'huile mauvaise, acide, en produit consommable, neutre et insipide sans toute fois la rendre plus fine et plus riche en antioxydants. L'inconvénient majeur de ce procédé de raffinage est d'éliminer les vitamines et les composés phénoliques. Dans cet entendement nous avons jugé utile de valoriser les huiles de table par ajout des antioxydants des margines par exemple.



200 µg d'antioxydants obtenus par ce procédé sont d'abord dissous dans 200g d'huile de table végétale. Les échantillons sont ensuite introduits dans une étuve réglée à  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . L'étude du potentiel antioxydant est réalisée en comparaison avec l'huile d'olive, et l'huile de table enrichie en tocophérol et en  $\beta$ -carotène séparément.

Le suivi de la stabilité des huiles enrichies par les antioxydants des margines est réalisée conformément à la méthode appliquée par le conseil oléicole international (AOC) au contrôle des transactions commerciales des huiles à savoir indice de peroxyde (IP) pendant 1 mois.

De ces résultats, on constate que l'ajout des antioxydants des margines (AOM) rapproche l'huile de table à l'huile d'olive vierge. Le mélange des antioxydants des margines (AOM) sont plus efficaces que le tocophérol et La  $\beta$ -Carotène connus pour leur activité antioxydante. La  $\beta$ -Carotène à elle seule n'a pas d'effet significatif sur la protection des huiles. Dans l'industrie agroalimentaire la  $\beta$ -carotène est ajoutée simultanément avec le tocophérol (fig. 2).

### **Exemple d'application n°2: Amélioration de la margarine**

Dans cette partie, les mêmes techniques d'analyses utilisées dans l'exemple (1) ont été utilisées.

Les lipides végétaux hydrogénés ont été utilisés comme matrice d'étude de la stabilité des lipides par l'ajout des extraits antioxydants des margines. Comme témoins nous avons fait appel à la  $\beta$ -carotène (3000 UI/100g) et à l' $\alpha$ -tocophérol (2 UI/100g). Les résultats résumés dans la figure 3 montrent que les antioxydants extraits des margines protègent bien la margarine contre l'oxydation plus que les autres antioxydants. Ainsi les bas indices de peroxyde sont obtenus avec les antioxydants des margines (AOM). Les tests organoleptiques de la margarine enrichie par les antioxydants des margines confirment que ce produit est de très bonne qualité et riche en antioxydants bénéfique pour la santé humaine.

Les résultats résumés dans la figure 3 confirment ceux trouvés dans l'exemple 1 et confirment la généralité de l'activité des extraits bios active à activité antioxydante des eaux résiduelles des fruits oléagineux. Ces deux exemples, parmi d'autres, garantissent le rôle que peut jouer ce produit dans plusieurs industries comme l'industrie agroalimentaire, cosmétique, pharmaceutique et autres ...

L'originalité de ce procédé réside dans sa simplicité et son efficacité au niveau de la résolution des problèmes de l'environnement engendrés par les eaux résiduelles des fruits oléagineux avec une haute valeur ajoutée et possibilité de son application à l'échelle industrielle.

### **Références :**

**A. Moukal (2004)** L'arganier, *Argania spinosa* L. (skeels), usage thérapeutique, cosmétique et alimentaire Journal Phytothérapie Springer Paris Volume 2, Number 5 135-141

**A.Saija, D.Trombetta, R.Lo Cascio,P ;Princi,N.Uccella, F.Bonina,F. Castelli (1998) :** In vitro evaluation of the antioxidant activity and biomembrane interaction of the plant phenols oleuropein and hydroxy-tyrosol, Int. J. Pharmaceut. 166 (1998) 123-133.

**D.Ryan, K. Robards, S.Lavee (1999),** Changes in phenolic content of olive during maturation Int.J. Food.sci. Thec 34 (1999) 453-456.

**G.Bisignano, A.Tomano, R.Lo Cascio, G. Crisafi, n. Uccella, A. Saija, (1999)** On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol, J. Pharm pharmacol. 31 (1999) 971-974.

**R.W.Owen, A.Giacosa, W.E.Hull, R.Haubner, B.Spiegelhalder, H. Bartsh (2000)**, The antioxydant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil, Europ. J. Cancer 36 (2000) 1235-1247.

**M.H.Gordon, F.Paiva-Martins, M.Almeida (2001)**, Antioxydant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols, J. Agric.Food Chem. 49 (2001) 2480-2485.

**R.Briante , M.Patumi, F.febbario, R.Nucci (2004)**. Production of highly purified hydroxytyrosol from *Olea europea* leaf extracts biotransformed by hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase. Journal of Biotechnology 111 (2004) 67-77.

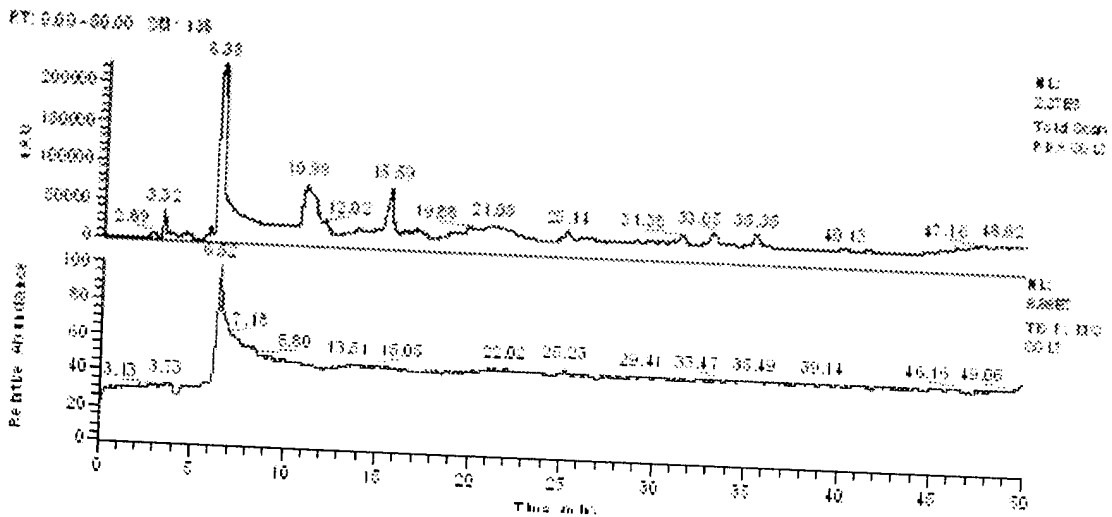
## Revendications

1. Procédé pour extraire et stabiliser les antioxydants des eaux résiduelles des fruits oléagineux et particulièrement les antioxydants hydrophiles de la margine d'olive préalablement soumise à une extraction des lipides résiduelles caractérisé en ce qu'il comprend :
  - (a) une hydrolyse afin d'obtenir une solution aqueuse riche en antioxydants,
  - (b) un traitement par la chitine pour éliminer des composées indésirables,
  - (c) une évaporation sous vide à une température comprise entre 40 et 70°C à une pression de 60 à 100 mbar. Après élimination de 50 % d'eau on ajoute la gélatine alimentaire de 0.5 à 3 %
  - (d) un séchage par atomisation en présence de la gélatine alimentaire,
  - (e) puis une extraction sélective du constituant désiré à une concentration élevée.
  - (f) Une reprise du constituant à activité antioxydante dans l'eau pure.
  - (g) La soumission du composé à activité antioxydante dans l'eau pure à la lyophilisation.
2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la dite hydrolyse est acide et est mené à  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 24h avec agitation de 100 Tours/minutes.
3. Procédé selon la revendication 1 caractérisé par une purification par la chitine.
4. Procédé selon la revendication 1(c) caractérisé par une évaporation sous vide (rota vapeur) 40 à 70°C à une pression de 60 à 100 mbar et élimination de 50 % d'eau.
5. Procédé selon la revendication 1 caractérisé par l'utilisation de la gélatine alimentaire.
6. Procédé selon les revendications 1 et 5 caractérisé en ce que le rapport pondéral de la gélatine alimentaire ajoutée est compris entre 0,5 et 3 % des eaux résiduelles des fruits oléagineux.
7. Procédé selon les revendications 1, 5 et 6 caractérisé en ce que le rapport de la gélatine alimentaire utilisée est de préférence 2 %.
8. Procédé selon les revendications 1, 5, 6 et 7 caractérisé en ce que le mélange composés organiques à activité antioxydante et gélatine alimentaire est soumis à un séchage par atomisation.
9. Procédé selon les revendications 1 et 8 caractérisé par l'extraction sélective de la phase solide obtenue par atomisation de l'antioxydant désiré (hydroxytyrosol, flavonoides, tyrosol et acide caféique par exemple).
10. Procédé selon les revendications 1 à 9 caractérisé en ce que les extraits montrent une teneur entre 60 à 70 % en antioxydants en poids.
11. Procédé selon les revendications 1, 9 et 10 caractérisé en ce que l'extrait à activité antioxydante obtenu est repris dans l'eau pure puis soumis à une lyophilisation
12. Procédé selon la revendication 11 caractérisé en ce que l'antioxydant extrait est présent à un rapport de 2 à 10 % dans l'eau pure ajoutée.
13. Procédé selon les revendications 11 et 12 caractérisé en ce que le rapport est de préférence de l'ordre de 8 %.

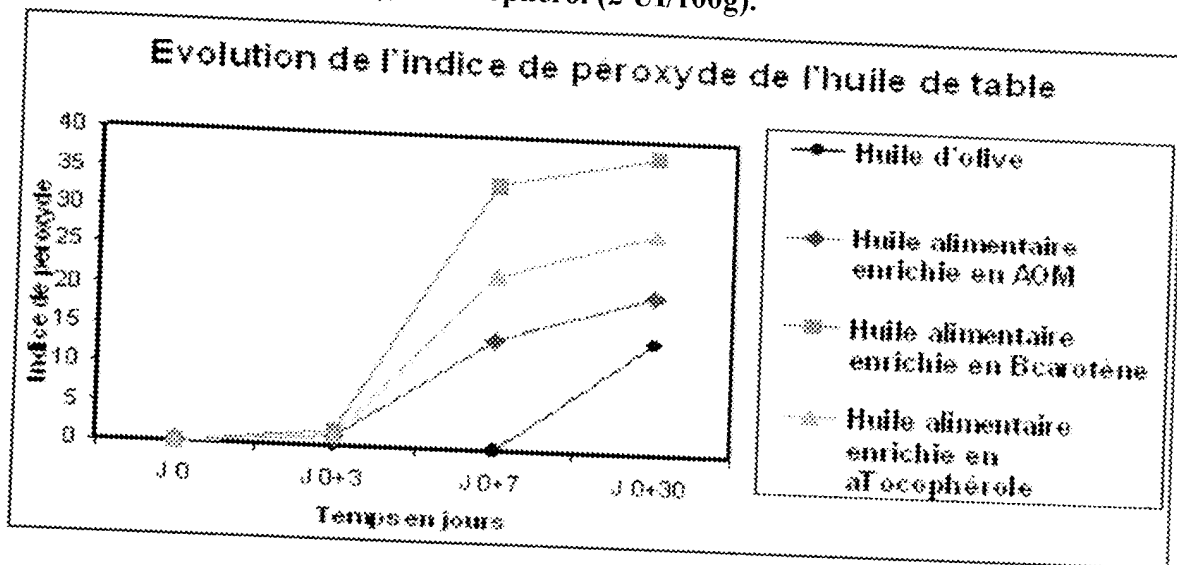


14. Procédé selon les revendications 11, 12 et 13 caractérisé en ce que les molécules à activité antioxydantes repris dans l'eau pure sont soumis à la lyophilisation et les quelles ne sont pas dégradés.
15. Procédé selon la revendication 1 et 14 caractérisé en ce que le composé phénolique à activité antioxydante obtenue par le dit procédé est sous forme de poudre et ou de cristaux lyophilisés.
16. Procédé selon les revendications 11, 14 et 15 caractérisé en ce que la poudre contenant les molécules organiques bioactives à activité antioxydante obtenue par lyophilisation présente une dispersion très homogène dans l'eau.
17. Procédé selon les revendications 1 à 16 caractérisé en ce que les extraits de molécules à activités antioxydantes soumis à la lyophilisation gardent la totalité de leur activité antioxydante : Test DMPD.
18. Procédé selon les revendications 1 à 16 caractérisé en ce que les extraits de molécules à activités antioxydantes soumis à la lyophilisation sont soumis à un emballage sous vide.

**Figure 1 :** exemple de spectre HPLC montrant l'importance de l'extraction sélective l'Hydroxytyrosol dans ce procédé.

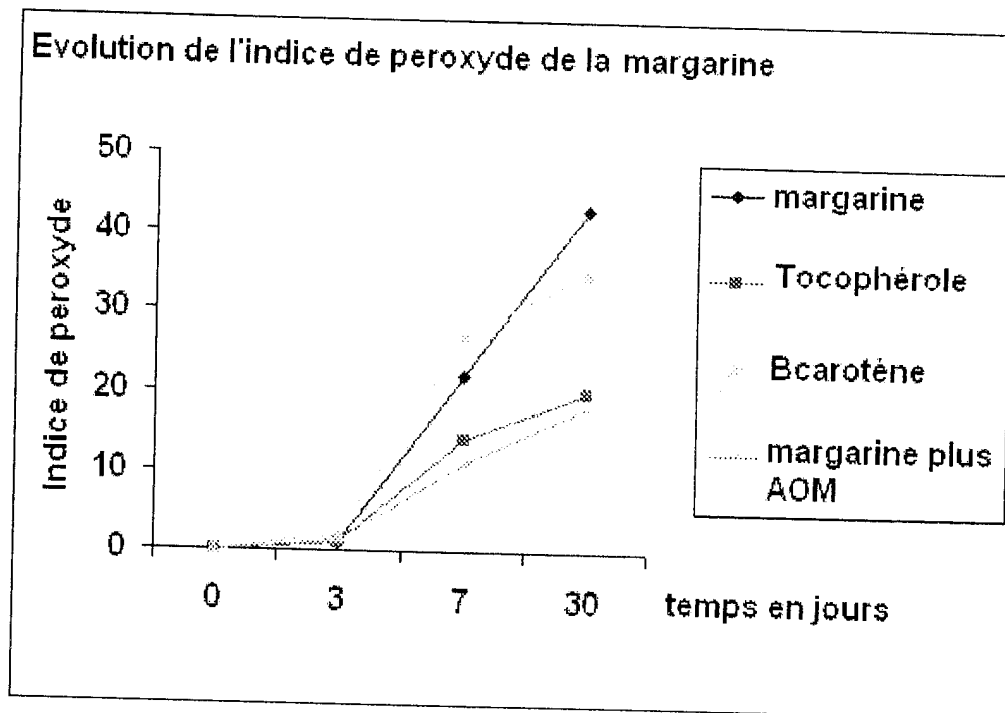


**Figure 2 :** Evolution de l'indice de peroxyde de l'huile alimentaire végétale.  
 AOM : antioxydants des margines 100µg/100ml  
 β-Carotène (3000 UI/100ml), α-Tocophérol (2 UI/100g).



*Handwritten signature*

**Figure 3 :** Evolution de l'indice de peroxyde des margarines préparées au laboratoires est enrichies par les antioxydants des margines, le  $\beta$ -carotène et l'  $\alpha$ -tocophérol.



AAA