

Année Universitaire : 2010-2011

Master Sciences et Techniques : CMBA
Chimie des Molécules Bio Actives



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et
Techniques

Titre

*Production de la vitamine C par le champignon BGF et à partir
du persil et poivron rouge*

Présenté par:

MOURHLY Asmaa

Encadré par:

- Pr. M. BENLEMLIH
- Pr. Y. KANDRI RODI

Soutenu Le 25 Juin 2011 devant le jury composé de:

- | | |
|--------------------------------|------------------|
| - Pr. F. OUAZZANI CHAHDI(FSTF) | Examineur |
| - Pr. Kh. SKALLI (FSTF) | Examineur |
| - Pr. M. BENLEMLIH (FSDM) | Encadrant |
| -Pr. Y. KANDRI RODI (FSTF) | Encadrant |

**Stage effectué à : Laboratoire de Biotechnologie (LB) de la Faculté des Sciences Dhar El
Mahraz**

Nom et prénom: MOURHLY Asmaa

Titre: Production de la vitamine C par le champignon BGF et à partir du persil et poivron rouge

Résumé

Le persil et le poivron rouge deux aliments utilisés pour l'extraction de la vitamine C par voie chimique à l'aide de deux solvants organiques le méthanol et l'acide métaphosphorique, on quantifiant leurs teneurs en vitamine c avec une méthode iodométrie. Les résultats obtenus sont assez proches de ceux cités en bibliographie (valeur théorique). Pour le persil, on a obtenu une incertitude d'environ 0,13; donc $(1,87 \pm 0,13)$ mg/g. La valeur théorique étant entre 1,6 et 2mg/g. Pour le poivron rouge, on a obtenu une incertitude d'environ 0,39 ; donc $(1,61 \pm 0,39)$ mg/g, la valeur théorique étant entre 1,6 et 2mg/ g.

On sait bien que la vitamine c se dégrade facilement avec la température, le temps et la lumière. Ce qui nous a permis de faire une optimisation sur ces facteurs. Les résultats obtenus montrent une baisse considérable de la teneur en vitamine C dans le persil et le poivron rouge à cause de :

Le choix du solvant : l'utilisation d'un acide sert à maintenir le milieu acide et son oxydation par l'oxygène est ralentie, ce qui permet de stabiliser la vitamine C sous sa forme réduite. La vitamine c diminue et varie légèrement quand la température augmente. Le temps et la lumière sont néfastes pour la vitamine C, la vitamine C se détruit très facilement.

La vitamine C, antioxydant majeur, joue un rôle fondamental dans des centaines de réactions biologiques. Le présent travail a aussi pour objectif d'évaluer l'activité antioxydante par la méthode de blanchissement du β -carotène des extraits le persil, le poivron rouge et un comprimé effervescent de vitamine C ainsi que le BHT comme standard. L'inhibition la plus élevée a été fournie par le persil (76,67%) suivie par le poivron rouge (64,92%) et en dernier lieu par le comprimé (45,64%).

La production de la vitamine C par voie biologique à partir d'un champignon *BGF* était explorée. A travers les résultats de cette étude, on a démontré l'utilisation réussie de *BGF* comme un biocatalyseur pour la glycosylation de l'acide ascorbique. Une très forte concentration de l'acide ascorbique a été obtenue à l'aide de *BGF*.

Mots clés: Vitamine C ; Acide ascorbique ; Persil ; Poivron Rouge ; Dosage Iodométrie ; Activité Antioxydant ; *BGF* ; Bioconversion.

Dédicaces

À la mémoire de ma sœur Fatima

Ô Dieu ! Pardonne-lui et accorde-lui Ta miséricorde. Accorde-lui le salut et le pardon. Assure-lui une noble demeure. Elargis-lui sa tombe et lave-le avec l'eau, la neige et la grêle. Nettoie-le de ses péchés comme on nettoie le vêtement blanc de la saleté. Fais-la entrer au Paradis et préserve-la du châtement de la tombe

À ma mère

Aucun mot ne saurait exprimer mon amour, mon affection et ma grande considération pour toi, pour tous les sacrifices que tu as consentis pour mon éducation, instruction et mon bien être. Veuillez trouver dans ce travail, l'humble gratitude d'une fille fidèle et reconnaissante. Que Dieu, le tout puissant, te procure bonne santé et longue vie.

À mon Père Que ce modeste travail puisse être une infirme reconnaissance pour la tendresse, l'affection, le soutien et les sacrifices que tu n'as cessés de manifester tout au long de mon éducation et ma formation. Aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments d'amour et de respect envers toi. Que Dieu te procure bonne santé et très longue vie.

À mon frère Ayoub et ma sœur Bouthayna

À qui je dois énormément d'amour et de reconnaissance.

À mes chères cousines ET cousins

Que vous acceptiez ici l'hommage de ma gratitude, qui, si grande qu'elle puisse être, ne sera jamais à la hauteur de votre tendresse et votre dévouement.

Puisse Dieu, le tout puissant, nous unir pour toute la vie.

À mon oncle Omarque j'aime beaucoup,

À toute ma famille DOUKHA et MOURHAM

A tous ceux qui me sont chers

« La connaissance est la seule chose qui s'accroît lorsqu'on la partage »

Sadra Boudjema – Ordre du grand vol

Asmaa MOURAHMY



Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

Le présent travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Biotechnologie (LB) dans l'équipe de Biotechnologie de l'environnement de la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz.

A Monsieur le Professeur Fouad CHAHDI OUAZZANI, directeur de l'UFR de la chimie des molécules bioactives, à qui j'adresse ma profonde gratitude pour les Conseils éclairés et les encouragements qu'il n'a cessé de me prodiguer tout au long de notre formation.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à mon encadrant à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz Monsieur le Professeur Mohamed BENLEMLIH, directeur du laboratoire de Biotechnologie, pour son aide précieuse, son encouragement et sa disponibilité jamais démentie tout au long de ma période du stage.

Monsieur le Professeur KANDRI Youssef à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, je vous suis reconnaissante d'avoir accepté de faire partie des membres du jury de mon mémoire.

J'exprime ma reconnaissance à Monsieur SKALLI Khalid Professeur à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, qui m'a fait l'honneur de juger et ce travail. Je vous remercie pour votre présence lors de la soutenance de ce mémoire.



Madame Fouad CHAHDI OUAZZANI, je vous adresse mes remerciements pour avoir accepté de juger ce travail. Je vous remercie pour votre présence lors de la soutenance de ce mémoire.

Que Messieurs FADILE Abdelaliet Ghanam Jamal, Docotorants à la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz qui ont suivi de très près ce travail; il n'ont épargné aucun effort pour m'aider à soulever toutes les difficultés rencontrées, leurs remarques et leurs précieux conseils donnés avec une extrême mabilité, ont été très utiles pour mener à bien le présent travail. Je vous remercie vivement.

Aux doctorants du laboratoire de Biotechnologie de la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz :LOULIDI Ghizlane, TALOUIZTE Hakima, Asya MIMAD etBARIJAhmed.

Aux professeurs du département de la Chimie de la Faculté des Sciences et Techniques.

Et à toute personne qui m'a aidée de près ou de loin à réaliser ce travail.

Asmaa MOURHLY



Sommaire

INTRODUCTION.....	1
I- Généralités sur la vitamine C.....	3
I.1. Définition de la vitamine C.....	3
I-2. Les sources de vitamine C.....	3

I-2-1. Les sources végétales	3
I-2-2. Les Sources animales	4
I-2-3. Synthèse chimique artificielle	5
II- Présentation de la molécule de la vitamine C.....	5
II-1. L'acide L-ascorbique	5
II.2. L'acide Déhydro L-ascorbique	6
II-3. Isomères et produits d'oxydation de l'acide L-ascorbique.....	6
II-4. Dérivés de l'acide L-ascorbique.....	7
II-5. Propriétés physico-chimiques.....	7
II-6. Instabilité de la vitamine C	10
II-7. Le principe antioxygène de l'acide ascorbique	11
II-7-1. Voie de dégradation aérobie	12
II-7-2. Voie de dégradation anaérobie	13
III- Synthèse de l'acide ascorbique	14
III-1. Synthèse chimique.....	14
III-1-1. Définition	14
III-1-2. Intérêts de la chimie de synthèse.....	14
III-1-3. Procédé de synthèse chimique de l'acide ascorbique.....	15
III-2. Synthèse biologique ou la biosynthèse.....	16
III-2-1. Production bactérienne de l'acide ascorbique	17
III-2-2. Les levures.....	19
III-2-3. Les microalgues.....	20
III-2-4. La production de l'acide ascorbique glucoside par le mycélium <i>Aspergillus niger immobilisé</i>	22
IV- Les bienfaits de la vitamine C sur la santé	23
V- Présentation des aliments étudiés.....	25
V-1. Persil.....	25
V-2. Poivron rouge	26
VI- Méthodes d'extraction de la vitamine c	27
VI-1. Extraction sous vide assistée par micro-ondes.....	27
VI-2. Extraction par l'acide métaphosphorique	29
VII- Méthodes d'analyse de la vitamine c	29
VII-1. Dosages directs de la vitamine C.....	29
VII-1-1. Méthodes électrochimique.....	29

VII-1-2. Les méthodes fluorométriques.....	29
VII-1-3. Les méthodes photométriques	30
VII-1-4. Méthodes de titration	30
VII-1-5. Méthodes biochimiques	32
VII-2. Dosage de la vitamine C après l'avoir isolée de son substrat	32
VII-2-1. Méthode de l'isotachophorèse	32
VII-2-2. Méthode de la chromatographie en phase gazeuse.....	32
VII-2-3. Méthode de la chromatographie en couches minces	33
VII-2-4. Méthode de la chromatographie sur gel (Méthode de Bourgeois).....	33
VII-2-5. Méthode de la chromatographie en phase liquide haute performance.....	33
I- Extraction de la vitamine C	36
I-1. Extraction solide/liquide	36
I-1-1. Extraction par l'eau et l'éthanol.....	36
I-1-2. Extraction par l'acide métaphosphorique	36
II- Titrage indirecte de la vitamine C par iodometrie.....	36
II-2. Préparation des réactifs.....	36
II-2-1. Préparation de l'acide métaphosphorique.....	36
II-2-2. Préparation de la solution diiode	37
II-2-3. Préparation de la solution de thiosulfate de sodium de concentration 5.10^{-3} mol/l	37
II-3. Protocole de dosage	37
II-3-1. Titrage préliminaire de l'iode	37
II-3-2. Calcul de la concentration de la solution de diiode C_2	38
II-3-3. Titrage indirecte de la vitamine C (Eau et Ethanol)	38
II-3-4. Extraction par l'acide métaphosphorique	39
II-4. Calcul de la masse de vitamine C	40
II-5. Confirmation de la méthode de dosage	42
III- Production de la vitamine C par bioconversion à partir du glucose par le champignon « <i>BGF</i> »	42
III-1. Matériel biologique	42
II-2. Préparation des milieux de culture	42
III-3. Milieu de pré culture	42
III-4. Composition du Milieu de bioconversion	43
III-5. Préparation du stock	43

III-6. Repiquage.....	44
III-7. Purification de la souche	44
III-8. Production de la vitamine C (la bioconversion).....	44
III-9. Méthode de dosage colorimétrique du glucose par le DNS (acide 3-5dinitrosalicylique).....	45
III-9-1. Préparation du réactif de DNS (acide 3,5 dinitro-salicylique).....	45
III-9-2. Préparation de la gamme d'étalonnage	45
IV- Activité antioxydant de la vitamine C	46
IV-1. Préparation de la solution β -carotène/acide linoléique	46
IV-2. Essai au β -Carotene–linoleate bleaching	46
IV-3. Préparation des échantillons.....	46
IV-4. Expression des résultats	47
I- Optimisation de l'extraction de la vitamine C.....	48
I-1. Optimisation des rapports de solvants d'extraction	48
I-1-1. L'extraction du persil à partir des solvants différents.....	48
I-1-2. L'extraction du poivron rouge à partir des solvants différents	49
I-2. Optimisation de la température	50
I-2-1. L'extraction du persil par le mélange eau/ éthanol à différentes température 40, 60, 80°C	51
I-2-2. L'extraction du poivron rouge à différentes température 40, 60, 80°C	52
I-3. Optimisation du temps d'extraction.....	53
I-2-1. L'extraction du persil avec le mélange Eau/Ethanol en fonction du temps pour la température optimale 40°C	54
I-2-2. L'extraction du poivron rouge avec le mélange Eau/Ethanol en fonction du temps	54
I-2-3. Effet de l'exposition à la lumière et le temps sur l'extraction de la vitamine C par l'acide métaphosphorique	55
II- Production de la vitamine C par voie biologique.....	56
II-1. La bioconversion :	57
II-2. Conditions de production de la vitamine C par le champignon BGF	57
II-3. Confirmation de la méthode du dosage de glucose	58
II-4. Cinétique de la consommation du glucose par la souche BGF	58
II-5. Dosage de la vitamine C dans le milieu qui contient la souche <i>BGF</i>	59
III- Activité antioxydant des extraits du persil et du poivron rouge	61
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	64

INTRODUCTION

Une bonne santé débute par une bonne nutrition elle-même synonyme d'une alimentation équilibrée. Cette alimentation ne doit pas seulement être une source d'énergie mais doit couvrir un apport en éléments indispensables au bon fonctionnement de l'organisme, éléments dont font partie les vitamines. On sait que l'organisme humain, depuis une mutation génétique intervenue il y a environ 55 millions d'années chez les ancêtres des singes et des hommes, et très pénalisé en ce qui concerne la vitamine C, puisqu'il ne peut plus la synthétiser directement dans son organisme et qu'il est donc totalement dépendant des apports alimentaires (Englard et Seifter, 1986).

Avec une production mondiale estimée à environ 110.000 tonnes par an, le marché de la vitamine C est de plus en plus concurrentiel (Macauley et al., 2001). La vitamine C prend une part importante dans différents domaines tel que l'industrie pharmaceutique (50%), l'industrie alimentaire (35%) et l'industrie des boissons (15%).

La vitamine C joue un rôle important dans le métabolisme des êtres vivants. C'est une substance qui présente aussi un intérêt important pour la chimie alimentaire, nutritionnelle et clinique. La détermination de l'acide ascorbique dans les aliments, les médicaments et les fluides physiologiques, naturels et préparés, est indispensable.

Beaucoup de méthodes ont été développées pour le dosage de la vitamine C. La plupart d'entre elles sont basées sur ses propriétés réductrices. Certaines de ces méthodes manquent de spécificité et sont sujettes à des interférences, quelques unes même ne sont pas adaptées à des échantillons colorés ou présentant des troubles. D'autres méthodes sont compliquées et nécessitent une durée longue pour l'analyse.

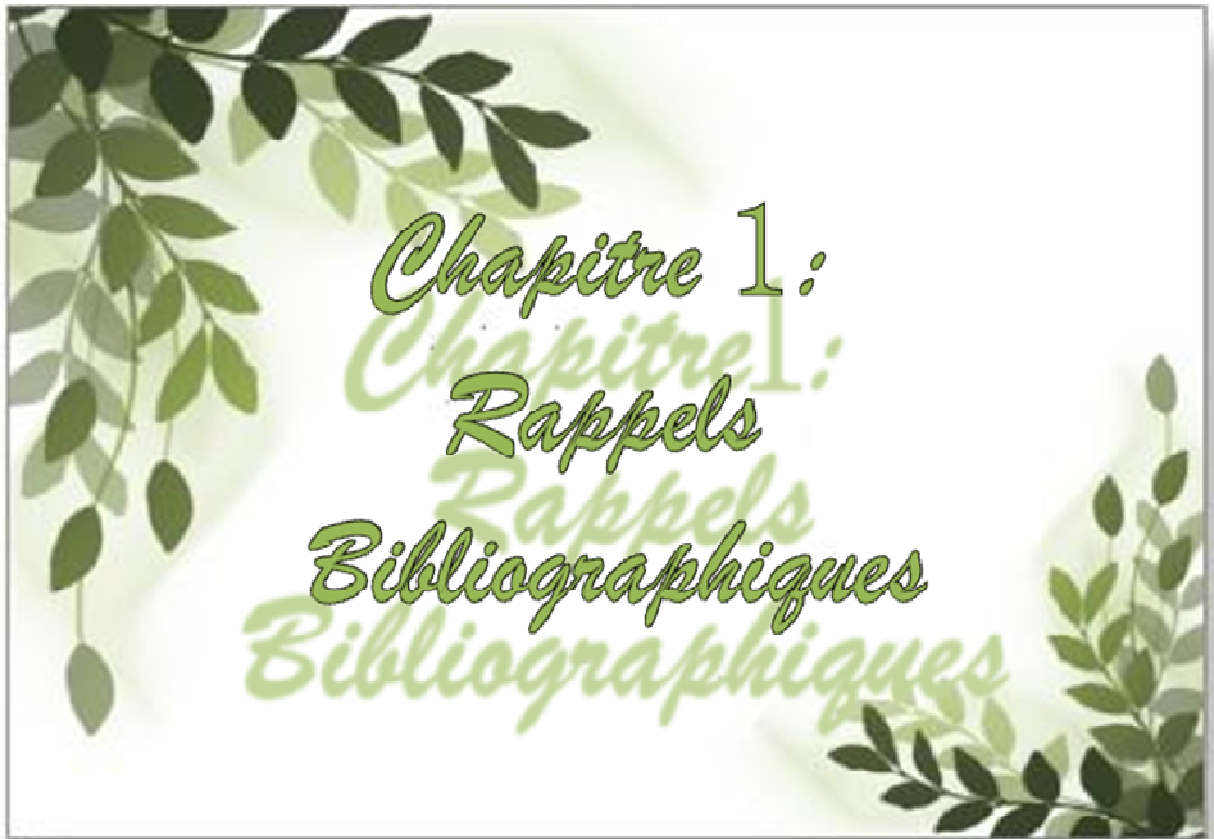
Au cours des 70 dernières années, le procédé chimique Reichstein qui fait la production de la vitamine C à partir du D-glucose a gagné tous les avantages qui seraient attendus après une si longue période d'application et de développement. Néanmoins, le processus est continu de consommer plus d'énergie; de hautes températures et des pressions élevées sont nécessaires pour certaines étapes du processus.

Ces contraintes économiques ont ouvert la porte à l'utilisation d'autres procédés de substitution. Par conséquent, la biotransformation microbologique utilisant des hypothèses raisonnables et des matières premières de faible coût a été sujet d'attention. La procédée

moderne de fermentation comme ainsi que des systèmes de cellules biocatalyse libre combinés avec innovations récentes en biochimie et biologie moléculaire ont soulevé les chances de développement d'une réussite processus. En outre, la disponibilité d'un nombre croissant de séquences du génome a amélioré le potentiel de la biotechnologie dans la production de l'acide ascorbique.

Les principaux objectifs de la présente étude sont :

- La mise au point une méthode naturelle d'extraction de la vitamine C à partir du poivron rouge et des feuilles de persil ; ces deux espèces ont été choisies :
 - ✗ Pour leurs teneurs importantes en vitamine C,
 - ✗ Pour leur disponibilité
 - ✗ Pour leurs prix.
- La production de la vitamine C par bioconversion catalysée par la "*souche BGF*" fournie par la banque des microorganismes du Laboratoire de Biotechnologie de la Faculté des Sciences Dhar El Mahrez.
- Comparaison de l'activité antioxydante entre les extraits de légumes et la vitamine C industrielle.



Chapitre 1:

Rappels

Bibliographiques

Bibliographiques

I- Généralités sur la vitamine C

Au début du XXe siècle l'étude de la maladie appelée le scorbut a conduit à la découverte d'un facteur antiscorbutique dans le jus de citron; c'est une substance active contre le scorbut dont certaines de ses propriétés physiques et chimiques ont été déterminées (Hardem et Zilva, 1918; Zilva et Wells, 1919). En 1933, Howart et Szent-Gyorgyi proposèrent de l'appeler la vitamine C.

I.1. Définition de la vitamine C

Le nom chimique de la vitamine C est l'acide L-ascorbique, forme lévogyre de l'acide ascorbique qui est la seule active. C'est une vitamine hydrosoluble ce qui signifie qu'elle reste dans l'organisme que pour une courte période, chimiquement très proche du glucose.

Comme tous les animaux, l'Homme a un besoin vital de vitamine C, mais contrairement à la majorité d'entre eux, il ne l'a synthétisé pas lui-même et doit donc la trouver dans son alimentation (Myriam P., 2006).

I-2. Les sources de vitamine C

I-2-1. Les sources végétales

La vitamine C ou acide L-ascorbique n'est pas synthétisée par le corps. Il doit être obtenu par l'alimentation ou la supplémentation. C'est une vitamine hydrosoluble trouvée dans les jus de fruits et légumes et facilement lixiviée dans l'eau de cuisson des aliments cuits. Elle est très sensible à l'oxydation et elle est détruite lorsque les cellules sont exposées à l'air.

Tableau 1 : Principaux aliments crus contenant de la vitamine C (AFSSA, 2001).

<u>Fruits, légumes et autres végétaux</u>	<u>Teneur en vitamine C (mg/100 g)</u>
Baie d'églantier, Acérola.	1200-1800
Cassis, persil frais, poivron rouge.	160-200
Poivron vert, radis noir.	100-150
Kiwi, poivron vert.	70-100
Fraise, litchi, cresson, ciboulette fraîche.	60-70
Orange et jus frais, citron, chou fleur, chou rouge.	50-60
Oseille, mangue, groseille, citron vert, clémentine, mandarine, épinard.	40-50
Pamplemousse et jus frais, mâche, jus de citron ou citron vert frais, laitue, cerfeuil, ail, mûre noire.	30-40
Melon, fruit de la passion, nectarine, mûre, framboise, myrtille, jus d'orange ou de pamplemousse à base de concentré, jus de citron pasteurisé, radis, courgette.	20-30

I-2-2. Les Sources animales

La majorité des espèces d'animaux synthétisent leur propre vitamine C. Il n'est donc pas une vitamine pour eux. La synthèse est réalisée à travers une voie de quatre étapes catalysées par des enzymes spécifiques qui convertissent le glucose en acide ascorbique. Elle est réalisée soit dans les reins, cas des reptiles et des oiseaux, ou le foie, en cas des mammifères et des oiseaux perchés.

La dernière enzyme dans la voie de biosynthèse qui est la -l gulonolactone oxydase, ne peut pas être exprimée chez l'Homme en raison du gène défectueux qu'il porte. La perte de

cette enzyme responsable de la synthèse l'acide ascorbique a eu lieu assez fréquemment au cours l'évolution, elle a touché la plupart des poissons, de nombreux oiseaux, certaines chauves-souris, des porcs Guinée et la plupart des primates, y compris l'Homme.

I-2-3. Synthèse chimique artificielle

La vitamine C est produite à partir de glucose par deux voies principales. Le processus Reichstein développés dans les années 1930 utilise une seul pré-fermentation suivie d'une voie purement chimique. Le Two-Step processus de fermentation plus moderne a été initialement développé en Chine dans les années 1960, utilise une fermentation supplémentaire pour remplacer une partie du produit chimique des étapes ultérieures. Les deux procédés donnent environ 60% de vitamine C à partir du flux du glucose.

En 1934, la société pharmaceutique suisse Hoffmann-La Roche a été le premier à produire en masse de vitamine C de synthèse, sous la marque du Redoxon. Principaux producteurs aujourd'hui sont BASF / Takeda, Roche , Merck et la Chine Pharmaceutical Group Ltd de la République populaire de Chine (Hickey, Steve et Roberts, Hilary, 2004).

II- Présentation de la molécule de la vitamine C

II-1. L'acide L-ascorbique

Le terme "vitamine C" est utilisé comme terme générique pour tous les composés possédant l'activité biologique de l'acide L-ascorbique (figure 1). Le principal composé naturel ayant une activité "vitamine C" est l'acide ascorbique, ce dernier est synthétisé par les plantes et la plupart des animaux, exceptes les primates et les cochons d'Inde (Fatibello-Filho et Vieira, 2000).

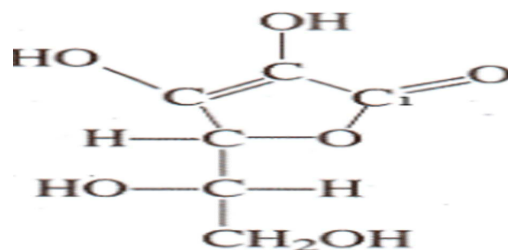


Figure 1 : *Formule développée de l'acide L-ascorbique.*

L'acide L-ascorbique est appelé parfois acide L-xyloascorbique car il peut être synthétisé à partir de la xylose. Sa formule développée correspond à l'acide lactone L-thréohexo-2 énonique. Ces trois appellations sont reconnues depuis 1965 par la Commission

de Nomenclature Biochimique. La dénomination acide L-ascorbique est de très loin la plus utilisée.

II.2. L'acide Déhydro L-ascorbique

Lors du stockage des aliments ou au cours de leur transformation, l'acide L-ascorbique peut s'oxyder partiellement en acide déhydro L-ascorbique (figure 2). Cette molécule possède une activité vitaminique identique à celle de l'acide L-ascorbique. La forme réduite et la forme oxydée sont en équilibre avec une forme radicalaire, instable, le radical ascorbyle (figure 2) (Guilland et al., 1998; Kim et al., 1996).

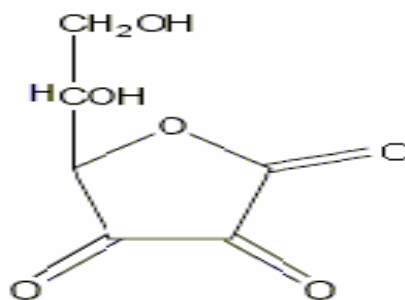


Figure 2 : Formule développée de l'acide déhydro L-ascorbique.

Des études récentes aux rayons X ont montré qu'à l'état cristallin, l'acide déhydro L-ascorbique était un dimère. Dans l'eau ce dimère s'hydrolyse en un monomère qui est l'hémiacétal (Meshal et Hassan, 1982). Le cycle de l'hémiacétal peut s'ouvrir pour restituer le groupement dicéto en positions 2 et 3.

II-3. Isomères et produits d'oxydation de l'acide L-ascorbique

Dans l'espoir de trouver des substances ayant une activité vitaminique supérieure à celle de l'acide L-ascorbique, un certain nombre d'isomères ont été synthétisés (figure 3). D'une façon générale, ces isomères qui n'existent pas à l'état naturel, sont dépourvus d'activité vitaminique, à l'exception de l'acide D-isoascorbique qui possède une légère activité antiscorbutique (2,5 à 5 % de celle de l'acide L-ascorbique). Dans l'industrie alimentaire, il n'est pas utilisé pour son activité vitaminique mais comme antioxydant (cet additif n'est pas autorisé en France). Les formes oxydées de ces isomères n'ont pas d'activité vitaminique.

II-4. Dérivés de l'acide L-ascorbique

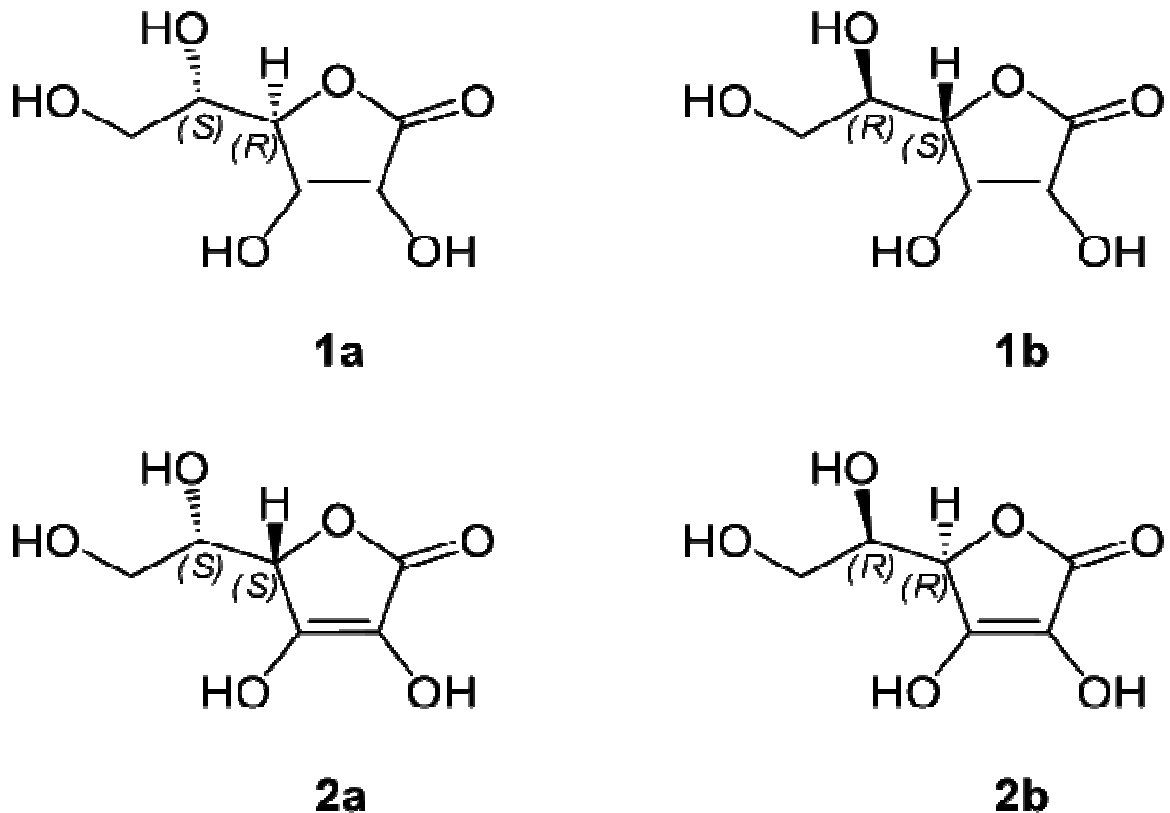


Figure 3 : Dérivés de l'acide L-ascorbique. (1a) : Acide L-ascorbique (vitamine C) ;(1b) : Acide D-ascorbique ;(2a) : Acide L-isoascorbique ;(2b) : Acide D-isoascorbique.

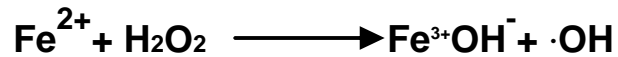
II-5. Propriétés physico-chimiques

L'acide ascorbique est une poudre cristalline, blanche, inodore, stable au contact de l'air, à la lumière du jour et à température ambiante pendant plusieurs mois, de saveur légèrement acide et qui se décompose à la température de 190°C. Il est facilement soluble dans l'eau, moins soluble dans l'alcool (Marez et al., 2004).

L'oxydation en milieu aérobie de l'acide ascorbique en présence d'ions de métaux de transition est la plus importante réaction responsable de la disparition de la vitamine C dans les aliments. En présence de dioxygène et de traces d'ions métalliques (Fe^{3+} et Cu^{2+} , en particulier) un complexe intermédiaire est formé subissant un transfert de deux électrons pour produire de l'acide déhydroascorbique et du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



Le peroxyde d'hydrogène ainsi forme conduit, en présence de Fe^{2+} , au radical hydroxyle "·OH" (Réaction de Fenton) selon :



La vitesse d'oxydation dépend des concentrations d'acide ascorbique et d'ions métalliques mais aussi de la teneur en ions H^+ du milieu; en effet à pH très bas, voisin de 1, l'acide ascorbique est complètement proton et plus difficilement oxydable qu'à un pH plus élevé (Grandazzi, 2002 ; Guillard et al., 1998).

L'ascorbate oxydase est l'une de très nombreuses enzymes que l'on rencontre chez les végétaux. En présence d'oxygène, elle catalyse l'oxydation de l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique selon la réaction suivante (Stevanato et al., 1985) :



Tableau 2: *Les principales propriétés physiques des acides L-ascorbique et déhydro L-ascorbique.*

Propriétés physiques	Acide L-ascorbique	Acide déhydro L-ascorbique
Formule brute	C₆H₈O₆	C₆H₆O₆
Aspect	cristaux blancs	cristaux blancs
Poids moléculaire	176,13	174,11
Point de fusion	190°-192° C avec décomposition	225° C avec décomposition
Pouvoir rotatoire	[α]²⁵+20,5 à 21,5(C=1 dans l'eau) [α]²³+48 (C = 1 dans le méthanol)	[α]²⁰+ 56 (C = 1 dans l'eau)
Solubilité	<ul style="list-style-type: none"> • 333g/1 d'eau • 50g/1 de propylène glycol • 33g/1 d'éthanol 95° • 20g/1 d'éthanol absolu • 10g/1 de glycérol USP • Insoluble dans: éther, éther éthylique, chloroforme, éthylique, chloroforme, éther de pétrole, huile éther de pétrole et solvants huileux. 	Très soluble dans l'eau

II-6. Instabilité de la vitamine C

La vitamine C est l'une des plus instables vitamines, elle se détruit facilement tant par les polluants chimiques que par la cuisson, dans ce cadre on peut noter que :

- ✘ L'acide ascorbique cristallisé est stable à l'air sec. En présence d'air légèrement humide, la vitamine s'oxyde rapidement en acide déhydro-ascorbique et se dégrade ensuite en composés inactifs. Elle est très fragile en solution.
- ✘ L'effet de l'exposition à la lumière sur la stabilité de la vitamine C reste controversé. Satarr *et al.* (1989) ont montré que la lumière artificielle (lumière fluorescente d'intensité 540-650 lux) avait un effet sur les pertes en vitamine C dans des jus d'orange modèles (contenant de l'acide citrique, du sucre, de l'acide ascorbique et de l'eau) stockés dans des bouteilles de verre à température ambiante (25-30°C) pendant 32 jours. Au contraire, Mottar (1989) ne trouvait aucune influence de l'exposition à la lumière naturelle comparée à une conservation à l'obscurité totale sur la teneur en acide ascorbique du jus d'orange à 5°C et à 20°C pendant 3 mois, aussi bien avec des emballages en polypropylène qu'avec des briques en cartons.
- ✘ L'oxydation de l'acide ascorbique est favorisée par la température (Kennedy *et al.*, 1992), la présence d'ions métalliques (fer et cuivre) (Khan et Martel, 1967), et la teneur en oxygène dissous (Solomon et Svanberg, 1995),
- ✘ La température est un autre grand ennemi de la vitamine C, une température élevée dénature l'acide ascorbique oxydase, enzyme trouvée dans les fruits et légumes, Comme cette enzyme catalyse le processus d'oxydation, la température peut servir à protéger la vitamine C.
- ✘ Gil-Izquierdo *et al.* (2002) ont mesuré les teneurs en vitamine C (acide ascorbique et déhydroascorbique) d'un jus avant et après pasteurisation à l'échelle industrielle, ces chercheurs n'ont observé aucune pertes de cette molécules après un traitement à 95°C pendant 30 s. A l'échelle pilote, Naim *et al.* (1997) observent une dégradation d'acide L-ascorbique de 11 % après une pasteurisation à 90- 92°C pendant 30s. Rassis et Saguy (1995) observent les mêmes teneurs en vitamine C avec des pasteurisations à 84, 87 et 90°C pendant 72 s. Il s'avère donc que les teneurs en vitamine C sont peu affectées par le traitement de flash-pasteurisation.
- ✘ S'altère rapidement pendant le stockage et la préparation des aliments.
- ✘ Se dégrade à l'ionisation et au pH neutre ou alcalin.

II-7. Le principe antioxygène de l'acide ascorbique

Les antioxygènes sont des composés capables de retarder l'oxydation par des mécanismes indirects tels que la complexation des ions métalliques ou la réduction de l'oxygène (Claude et Cheftel, 1977). Parmi ceux-ci, l'acide ascorbique qui est fortement réducteur. Cette molécule agit sur l'oxygène par oxydoréduction grâce à sa fonction ène-diol



et se transforme en acide déhydroascorbique (figure 4) qui a la même activité biologique que l'acide ascorbique. L'oxydation de l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique est réversible, mais le plus souvent, dans l'aliment, l'acide déhydroascorbique subit une hydrolyse irréversible qui conduit à la formation de l'acide 2,3-dicétogulonique (Manfred et Moll, 1998). Ce dernier, en solution aqueuse, après décarboxylation, peut donner l'hydroxy-3 pyrone-2 et l'acide furoïque.

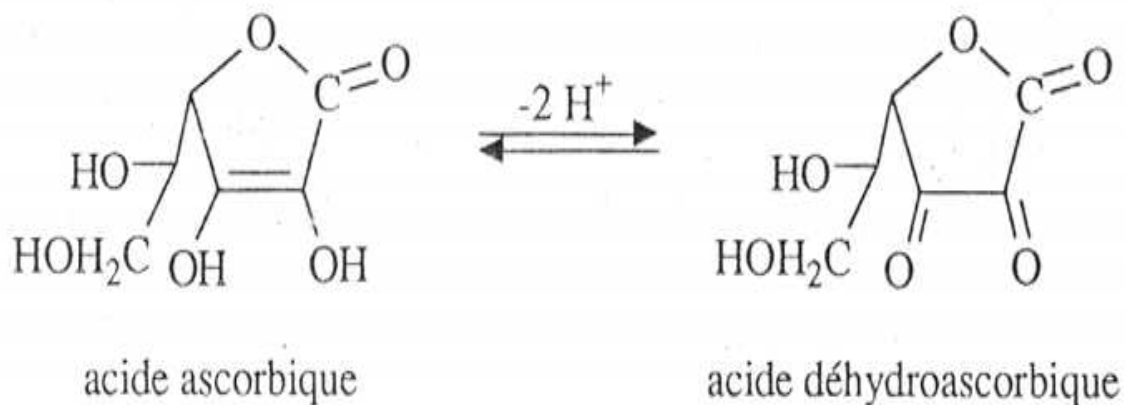


Figure 4 : Réaction d'oxydation de l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique.

En milieu alcalin, les réactions d'oxydation sont très rapides et provoquent une cassure de la molécule (Otani, 1964). La présence de sel de cuivre et de fer accélère la réaction de l'acide ascorbique avec l'oxygène. Pour le fer, la première étape de la réaction est la formation d'un complexe ternaire entre le métal, l'anion ascorbate et l'oxygène. Le complexe se dissocie en libérant de l'acide déhydroascorbique, l'ion fer et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Cette molécule réagit ensuite avec l'acide ascorbique pour donner de l'acide déhydroascorbique et de l'eau.

Tous ces mécanismes ont été mis en évidence dans la réaction d'oxydation de l'acide ascorbique par le radical hydroxyle OH^\cdot dans les réactions d'oxydation enzymatique. En absence d'air, l'acide ascorbique peut aussi se dégrader. En effet, ce phénomène peut se

produire soit lorsque le milieu est chaud, soit le milieu devient acide. L'acide ascorbique subit alors une déshydratation et une décarboxylation qui conduisent à la formation de CO₂ et de furfural. Cette dégradation anaérobie est observée dans les jus de fruits acide tels que le jus de citron ou même le jus d'orange conditionnés, dans des bouteilles en verre et ou de boites métalliques fermées hermétiquement. Dans le cas où l'oxygène se trouve encore dans le col de la bouteille qui a été fermée, on observe tout d'abord une dégradation de l'acide ascorbique par l'oxygène dissous, puis une dégradation lente anaérobie. La dégradation aérobie est environ 10 fois plus rapide que la dégradation anaérobie (Bourgeois, 2003).

L'acide ascorbique peut être mis aussi en rapport avec les différents schémas de réactions de brunissement entre les sucres réducteurs et les acides aminés.

II-7-1. Voie de dégradation aérobie

L'acide ascorbique par oxydation donne naissance à l'acide déhydro ascorbique (figure 5), qui a la même activité biologique que l'acide ascorbique. Cette oxydation est réversible mais dans les aliments, l'acide déhydroascorbique subit le plus souvent une hydrolyse irréversible qui conduit à la formation de l'acide 2,3-dicétogulonique. Ce dernier, en solution aqueuse, après décarboxylation, peut donner la 3-hydroxy-2-pyrone et l'acide 2-furoïque (Yuan et Chen, 1998). L'acide 2-furoïque est pratiquement sans odeur (Arctander, 1969).

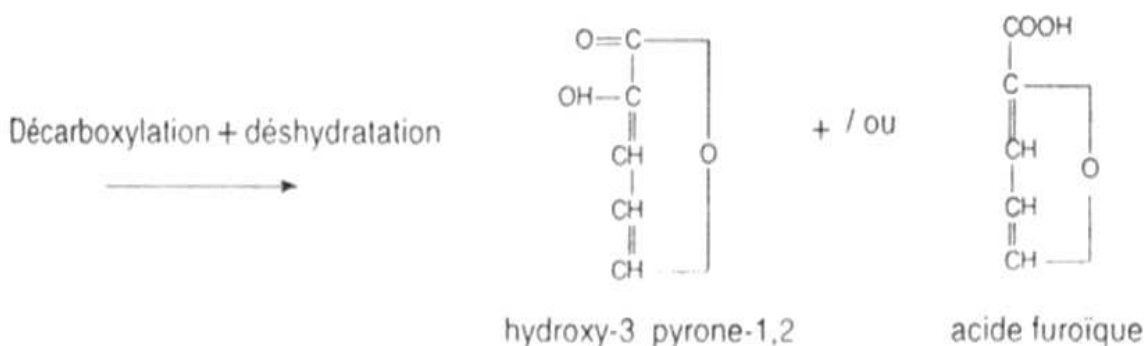
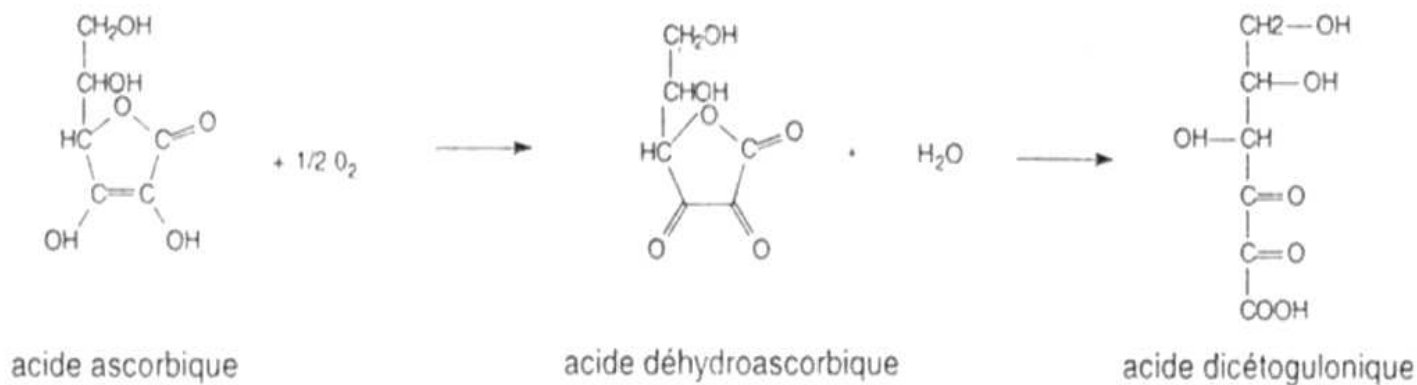


Figure 5 : Principaux produits de la dégradation de la vitamine C en présence d'oxygène (Yuan et Chen, 1998).

II-7-2. Voie de dégradation anaérobie

L'acide ascorbique peut aussi se dégrader en absence d'oxygène (figure 6). En milieu acide et à chaud, l'acide ascorbique subit une déshydratation et une décarboxylation qui conduisent à la formation de produits intermédiaires, de gaz carbonique et de furfural (Huelin et al., 1971).

Cette dégradation anaérobie a été observée dans les jus d'orange au cours de leur stockage. Dans le cas où le jus d'orange contient encore de l'oxygène dissous, une dégradation rapide de l'acide ascorbique par l'oxygène est observée suivie d'une dégradation plus lente en conditions d'anaérobiose (Kennedy et al., 1992). La voie anaérobie conduit, de la même manière que la voie aérobie, à la formation de produits intermédiaires qui peuvent être des réductones. Des composés volatils sont formés dont le furfural, qui est caractérisé par des descripteurs piquant, bonbon, pain, caramel, cannelle-amande (Arctander, 1969).

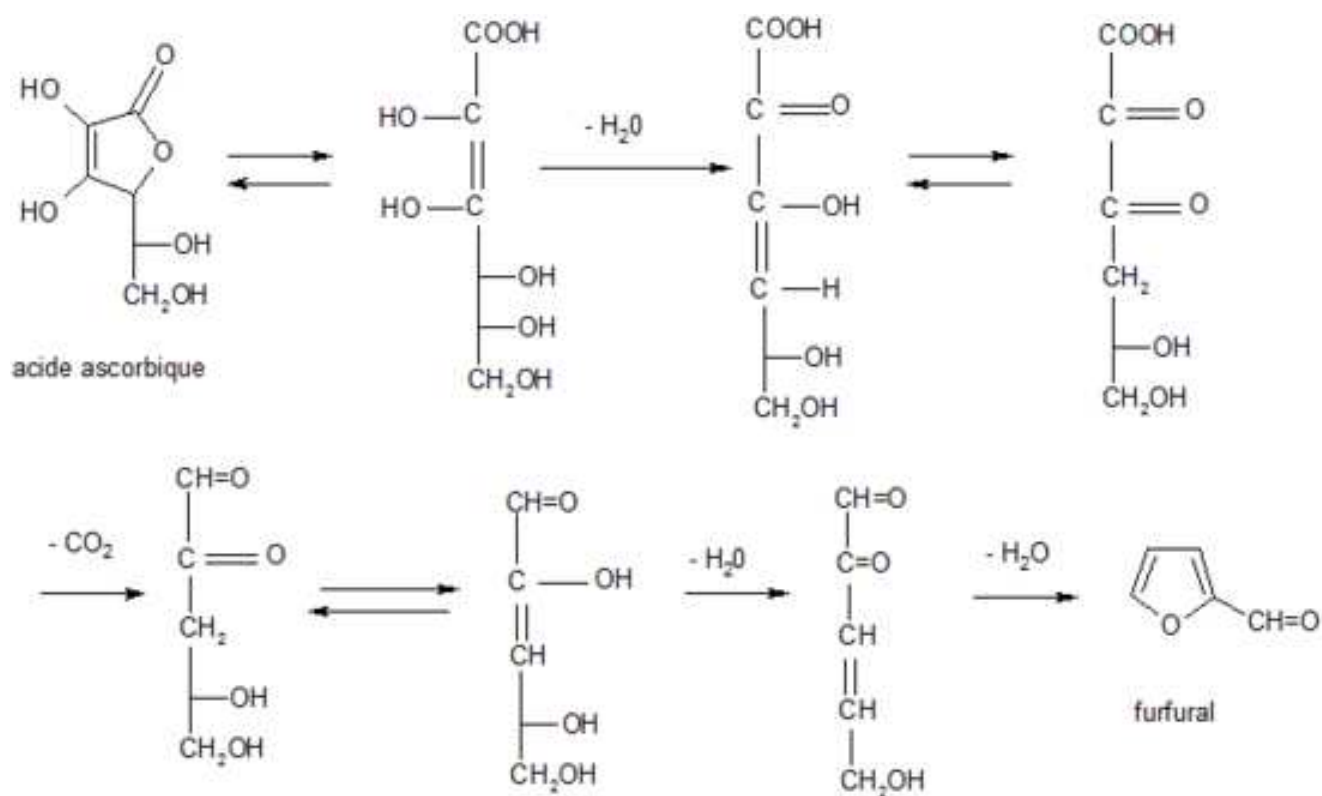


Figure 6 : Voie de dégradation anaérobie de la vitamine C en solution aqueuse, d'après (Yuan et Chen, 1998).

III- Synthèse de l'acide ascorbique

III-1. Synthèse chimique

III-1-1. Définition

La synthèse d'une espèce chimique est une réaction de transformation chimique au cours de laquelle des réactifs réagissent entre eux dans des conditions particulières pour donner un ou plusieurs produits dont l'espèce chimique recherchée.

III-1-2. Intérêts de la chimie de synthèse

La synthèse d'espèces chimiques est la fabrication d'espèces chimiques synthétiques, Pour des raisons de coût, de performance des produits, de préservation de l'environnement, de régularité des approvisionnements, etc, la synthèse d'espèces chimique (vitamine C, paracétamol ...) peut s'avérer plus intéressante que l'extraction (vitamine C extraite de l'acérola).

III-1-3. Procédé de synthèse chimique de l'acide ascorbique

Avec T. Reichstein débute, en 1933, une étape décisive, celle du passage du laboratoire de recherche à l'usine de fabrication. Ce chercheur propose à la firme F. Hoffman-la Roche de produire industriellement la vitamine C selon un procédé original qu'il a mis au point (Bruno et Nicolas, 2004).

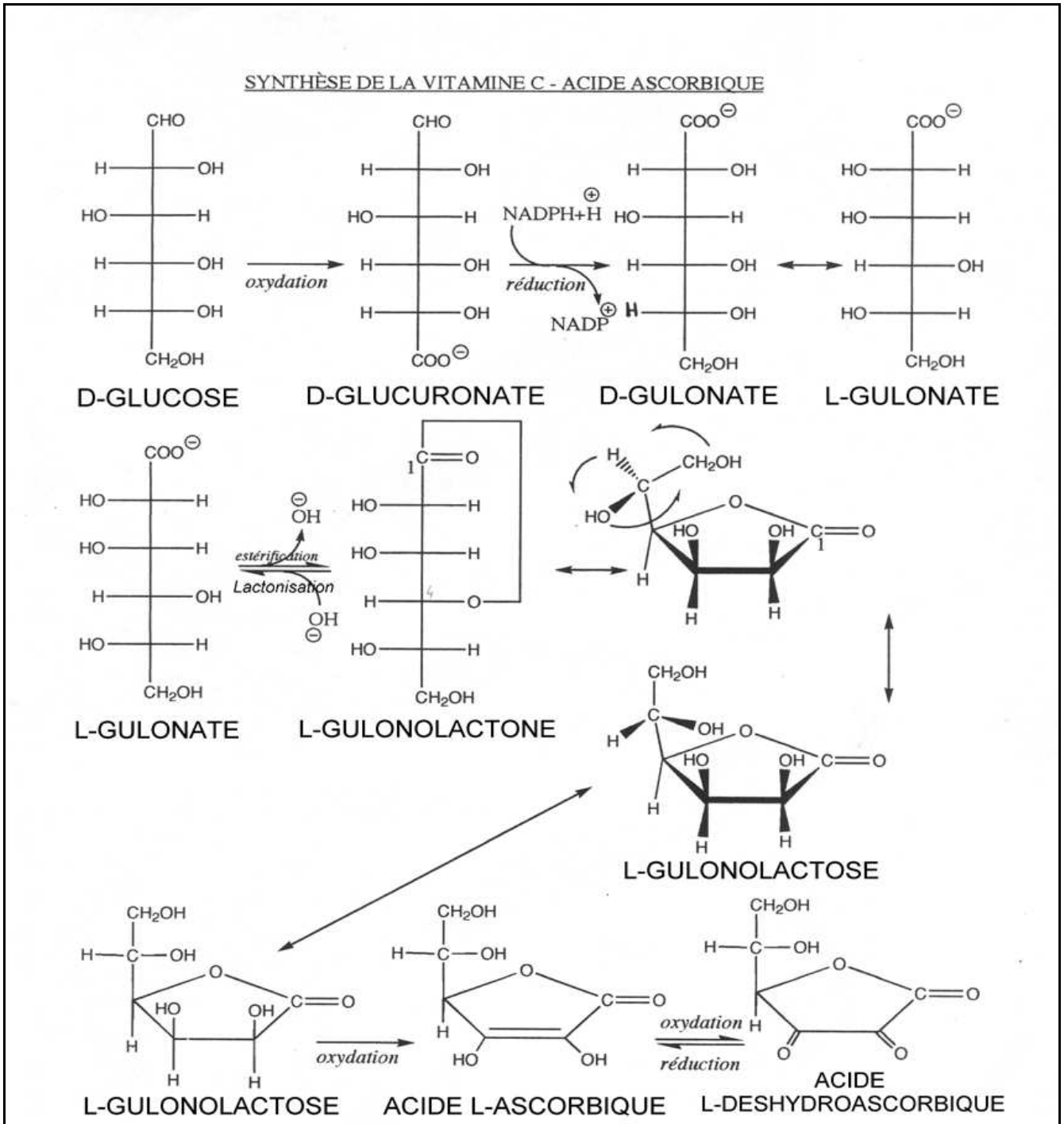


Figure 7 : Procédé de Reichstein-Grussner de synthèse de l'acide L-ascorbique.

III-2. Synthèse biologique ou la biosynthèse

Hancock et al (2002) ont substitué le procédé Reichstein de synthèse chimique à partir du glucose et en sept étapes par un procédé de bioproduction de l'acide ascorbique. Largement utilisé actuellement pour une production annuelle mondiale de 80 000 tonnes, en croissance de 3-4% par an, le procédé Reichstein est relativement efficace (rendement de 50%) après plus de 60 ans de développements continus, mais il consomme beaucoup d'énergie, dégage des effluents ennuyeux car on utilise de l'acétone, des acides sulfurique et chlorhydrique ainsi que de la soude.

Les premières tentatives ont consisté à fournir des intermédiaires du procédé Reichstein par voie biologique, Le rendement total de la synthèse (conversion du D-glucose en acide ascorbique) est de 15-18% (Figure 8).

Plusieurs étapes sont nécessaires pour modifier le D-glucose en vitamine C (Reichstein et Grüssner, 1934 ; Manfred et Al., 2000). La synthèse inclue une étape biologique nécessaire pour obtenir le bon stéréoisomère d'un produit intermédiaire.

Etape 1: Hydrogénation du glucose en D-sorbitol à l'aide d'un catalyseur nickel de Raney sous haute pression et à haute température.

Etape 2: Oxydation par fermentation microbienne du D-sorbitol en L-sorbose. La bactérie utilisée pour l'étape microbienne est *Acetobacter xylium* (Manfred et Al., 2000).

Etape 3: Protection des groupes hydroxyles par formation d'acétals à l'aide d'acétone et d'acide sulfurique à basse température.

Etape 4: Oxydation avec du permanganate de potassium en solution alcaline et élimination des molécules d'acétone par chauffage en présence d'eau.

Etape 5: Fermeture du cycle par formation d'une γ -lactone par chauffage dans l'eau à 100 °C (rendement de 20%) (Manfred et Al., 2000) ou par estérification et traitement au méthoxyde de sodium dans du méthanol suivie d'une acidification par l'acide chlorhydrique (rendement de 70%) (Manfred et Al., 2000).

Il existe une étape d'oxydation en présence d'oxygène et d'un catalyseur de platine qui permet la formation directe du composé intermédiaire acide 2-kéto-L-gulonique à partir de l'intermédiaire L-sorbose (Bronnimann et Al., 2000).

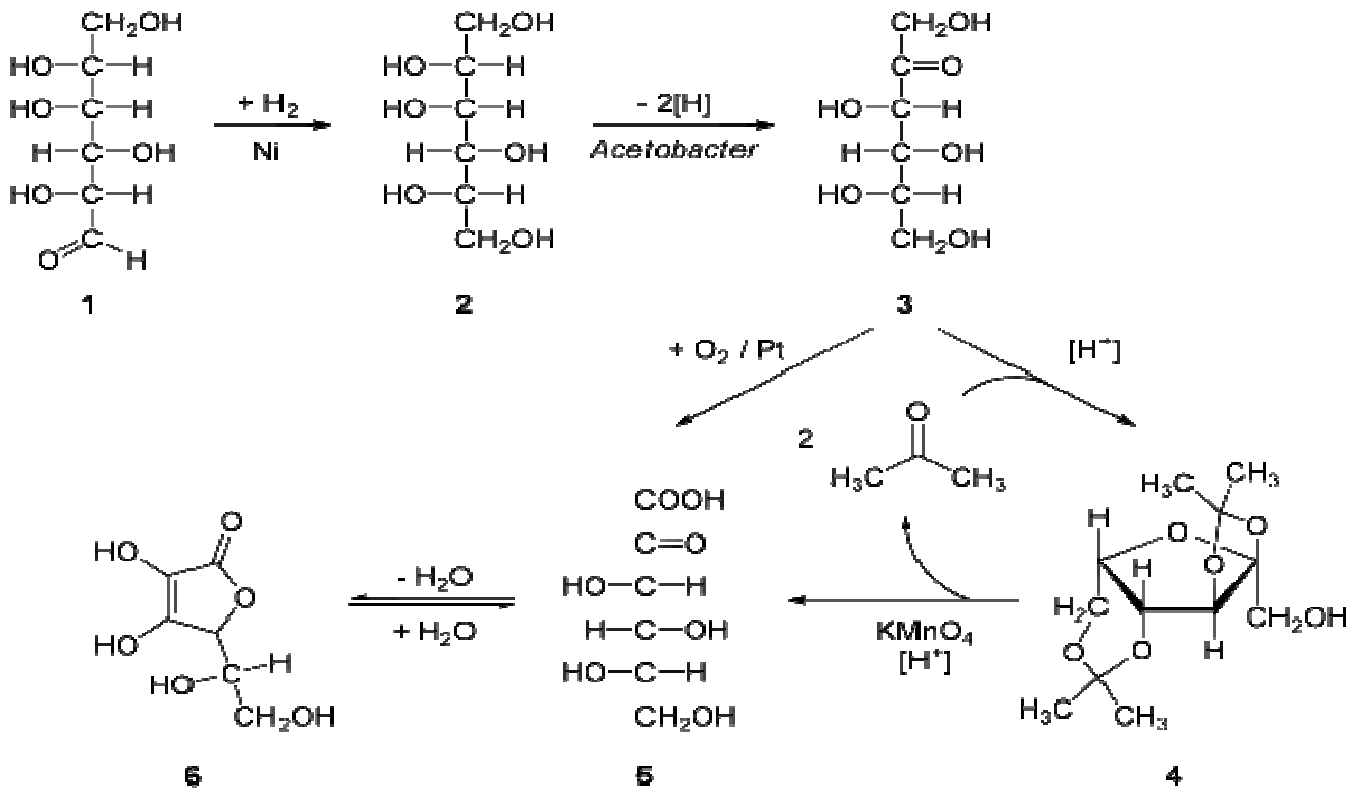


Figure 8 : Synthèse par biofermentation. Intervention de *Gluconobacter oxydans*. **1:** D-glucose; **2:** D-sorbitol; **3:** L-sorbose; **4:** 2,3 :4,6-di-O-isopropylidène- α -l-sorbofuranose; **5:**acide 2-kéto-L-gulonique; **6:** acide ascorbique.

III-2-1. Production bactérienne de l'acide ascorbique

Au cours des 20 dernières années, plusieurs stratégies ont été suivies en vue de simplifier la production de l'acide L-ascorbique, en utilisant des différentes souches bactériennes (Delic et al., 1989; Hancock et Viola, 2002). La production microbienne de 2-kéto-L-gulonate de D-glucose, D- sorbitol ou L-Sorbose peut être obtenue par différentes méthodes (figure 9):

- ii. Des approches impliquant la L-déshydrogénase-sorbose (FAD-SDH) et la L-Sorbosone-déshydrogénase cytosolique (Sugisawa et al., 1990 ; Saito et al., 1997, 1998) ou une liée à la membrane (Shinjoh et al., 1995).
- iii. 2-kéto-L-gulonate synthèse par 2-céto- D- gluconate et le 2,5-dicéto- D- gluconate de D-glucose (Sonoyama et Al., 1982 ; Anderson et al., 1985).
- iv. Conversion de la D-gluconate par 5-céto- D- gluconate de 2-kéto-L-gulonate (Gray, 1945a, b).

- ✘ DH: déshydrogénase;
- ✘ SLDH: D- sorbitol DH;
- ✘ SDH: l-Sorbose DH;
- ✘ SNDH: l-Sorbosone DH;
- ✘ GDH: D-glucose DH;
- ✘ G-2-DH: D- gluconate -2 DH;
- ✘ 2-KGA-DH: 2-céto- d - gluconate de DH;
- ✘ 2,5-DKGR: 2,5-dicéto -D- gluconate réductase.

III-2-2. Les levures

Depuis plusieurs années, il a été demandé si les levures sont capables de synthétiser intrinsèquement l'acide L-ascorbique, alors que certaines études ont rapporté la présence de l'acide L-ascorbique dans l'extrait de levure (Heick et al., 1969, 1972 ; Petrescu et al., 1992). Aujourd'hui, il est supposé que la levure ne peut pas produire l'acide L-ascorbique. Or, les levures sont capables de synthétiser l'acide D-érythroascorbique, molécule analogue de l'acide L-ascorbique (Figure 10). Bien que cette substance diffère structurellement de l'acide ascorbique, il possède des caractéristiques similaires de l'acide L-ascorbique. Huh et al (1998) ont utilisés les levures pour produire l'acide érythroascorbique ayant les mêmes effets que la vitamine C, notamment les propriétés antioxydantes.

Pour cette raison, l'acide D-érythroascorbic peut substituer l'acide ascorbique dans certaines applications industrielles. Cependant, l'acide D-érythroascorbique n'a pas d'activité antiscorbutique et, partant, il commande une plus faible valeur commerciale significative que L-acide ascorbique.

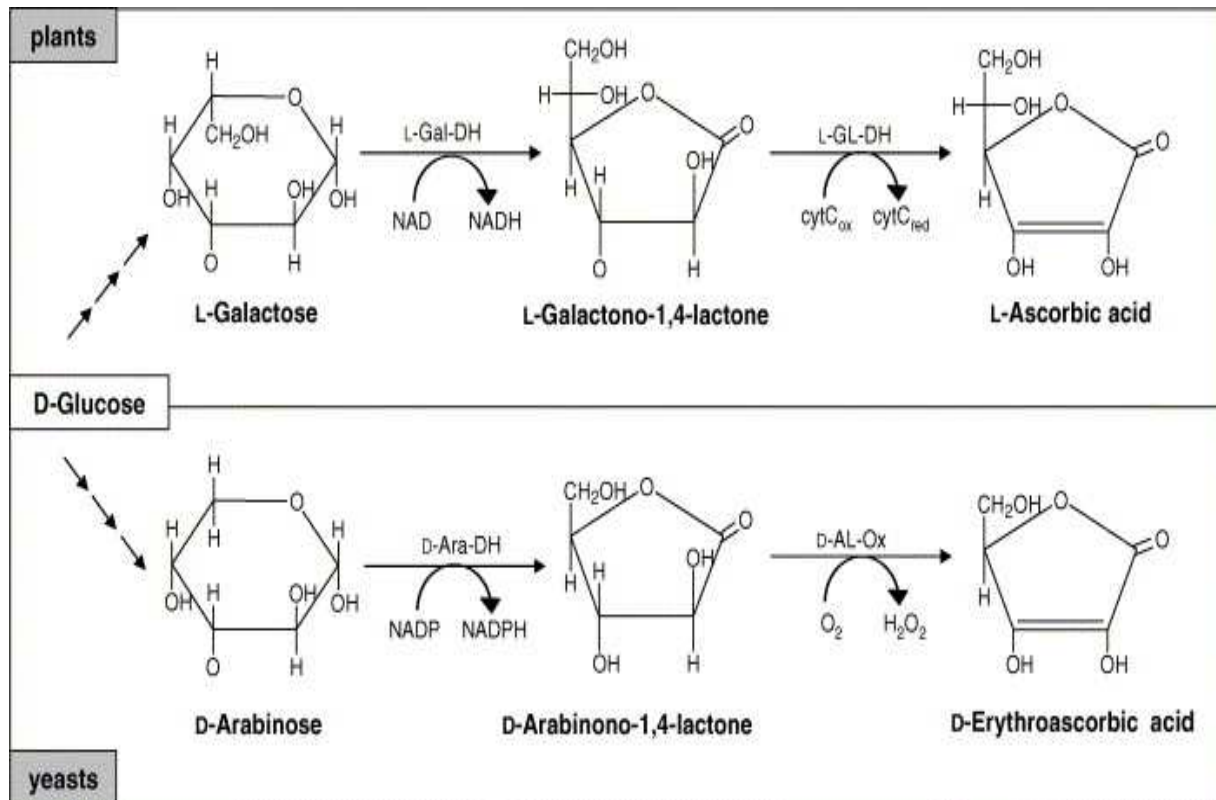


Figure 10 : Comparaison du parcours de la biosynthèse de l'acide L-ascorbique chez les plantes et de l'acide D-erythroascorbique chez les levures.

Chez les plantes, le glucose est converti en acide L-ascorbique en dix étapes (seules les trois dernières réactions sont représentées).

Chez les levures, l'acide D-erythroascorbic dans une voie similaire via le D-arabinose (seules les trois dernières étapes sont représentées).

- ✘ L-Gal-DH: L-Galactose DH;
- ✘ L-GL-DH: L-Galactono-1,4-lactone DH;
- ✘ D-Ara-DH: D-arabinose DH;
- ✘ D-AL-Ox: D-arabinono-L-lactone oxydase, 4.

III-2-3. Les microalgues

De nombreuses tentatives ont été prises pour accroître l'utilisation des microalgues pour la production directe de l-AA à partir de matières peu coûteuses. Running et al. (1994) ont décrit une seule étape de fermentation pour la production d'acide L-ascorbique à l'aide de la micro-algue verte hétérotrophe *Chlorella pyrenoidosa*. Alors peu de quantités allant jusqu'à 40 mg / l de L-AA ont été obtenues par la culture des cellules de type sauvage, après plusieurs

cycles des mutagènes chimiques et l'optimisation de la fermentation, des quantités améliorées allant jusqu'à 2 g/l ont été atteints, Les quantités produites correspondent à une amélioration de 70 fois de L-AA par rapport au type sauvage. Parce que la majeure partie de L-AA produite par les microalgues restée intracellulaire, le processus a été breveté en tant que méthode pour la production de L-AA enrichie de biomasse pour l'alimentation animale ou en tant que supplément diététique (Skatrud et Huss, 1991 ; Doncheck et al., 1996). Cependant, l'accumulation de la L-AA dans le milieu de fermentation a été obtenue par l'utilisation de la microalgue incolore *Chlorella sorokiniana* (Running, 1999; Running et al., 2002). En utilisant cet organisme qu'il a été démontré que la réduction du pH pourrait stabiliser L-AA dans le bouillon de fermentation, de sorte que la majorité de la L-AA est devenue exploitable à partir du milieu (Running et al., 1994; course, 1999).

Pendant les efforts d'amélioration des souches à l'aide de *Prototheca*, nombreuses souches mutantes ont généré des capacités accrues et réduites à accumuler L-AA ont été générés (Running et al., 2002). Ces mutants ont été utilisés pour aider à identifier une voie de biosynthèse de l'acide L-ascorbique contenant le mannose comme intermédiaire (Figure 11). Comme dans les plantes, L-Galactono-1,4-lactone est produite à partir D-glucose à travers le PIB-D-mannose, le PIB L-Galactose et L-Galactose. Enfin L-Galactono-1, 4-lactone est converti en L-acide ascorbique par L-GL-DH. Ce chemin a été décrit par Wheeler et al. (1998) chez les plantes supérieures et Berry et al. (1999), chez *P. moriformis*. Ces auteurs ont introduit de l'observation clé que la chaîne carbonée de D-glucose métabolisé est inversée dans la synthèse de L-AA, à la différence des voies décrit pour les animaux (Isherwood et al., 1954; Shigeoka et al., 1979 ; Helsper et al., 1982 ; Grün et Loewus, 1984 ; Running et al., 2003).

La définition d'une synthèse du L-AA par la voie de microalgues devrait faciliter l'ingénierie génétique de ces organismes pour accrue l'accumulation de L-AA et l'utilisation de ces microbes pour la production industrielle de L-AA à grande échelle.

Néanmoins, des études complémentaires sont nécessaires pour caractériser la meilleure approche pour stimuler la biosynthèse de L-AA par microalgues. Il est également difficile de savoir si les systèmes cellulaires de microalgues sont généralement capables d'une production commercialisée de L-AA.

En raison de leur taux de croissance plus lent et l'activité métabolique par rapport à des cultures bactériennes ou de levure, uniquement des traitements inrentables pourraient être réalisables.

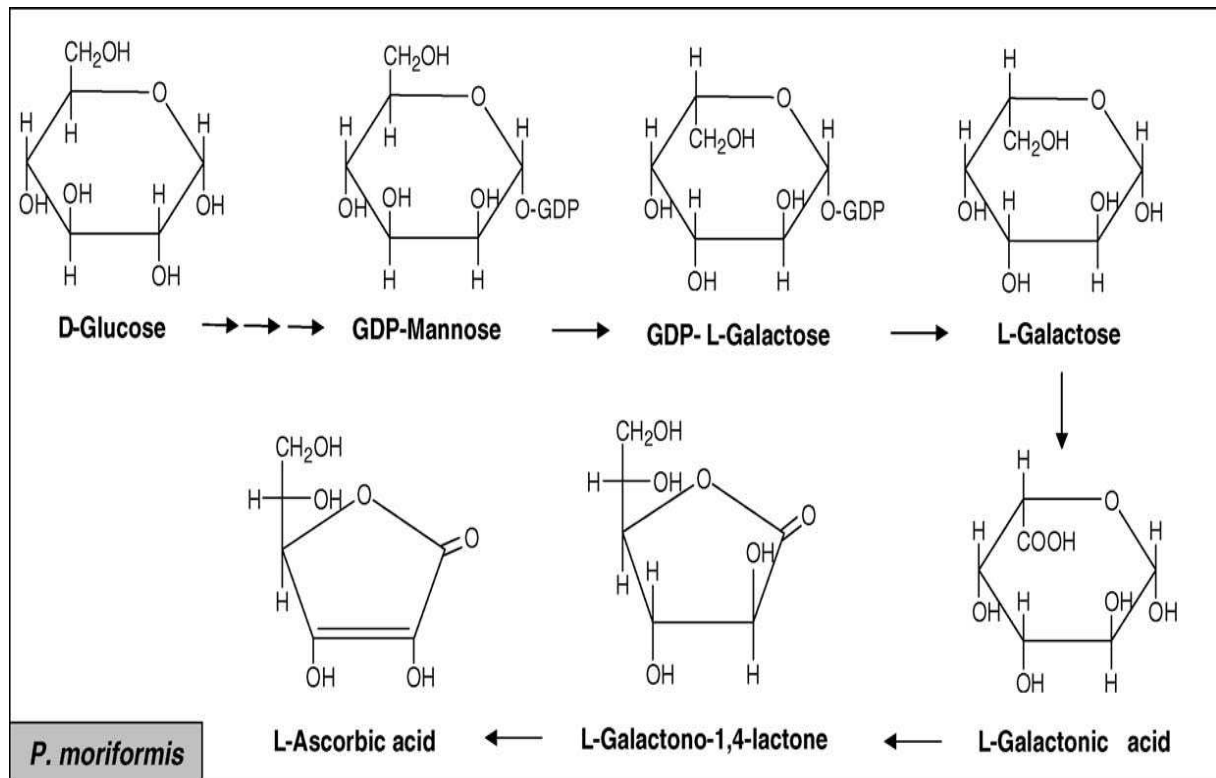


Figure 11 : Voie proposée du D-glucose à l'acide l-ascorbique dans *P. moriformis*.

(Seulement les cinq dernières réactions sont indiquées).

III-2-4. La production de l'acide ascorbique glucoside par le mycélium *Aspergillus niger* immobilisé

Le mycélium de *Aspergillus niger*, cultivées dans un milieu contenant 45 g/l de maltose, 66 g/l d'extrait de levure, et 5 g/l de K_2HPO_4 à 30 degrés C et 200 tr / min, ont été utilisés comme biocatalyseur dans la glycosylation de l'acide ascorbique. Le mycélium libre de la culture 3-jour, lorsqu'il est utilisé dans une réaction de 6-h avec du maltose comme donneur d'acyle, a donné 16,07 g/l glucoside acide ascorbique correspond à une productivité volumétrique de 2,68 g/l / h et une conversion de 67%. Les cultures de mycélium à partir 3-jours- ont été immobilisées dans des billes d'alginate de calcium et utilisé comme catalyseur dans la glycosylation de l'acide ascorbique. Un rapport molaire acide ascorbique/maltose de 1:9 a été jugée optimale, et la conversion atteint 75% après 12 h. La concentration de l'acide ascorbique glucoside produit à ce rapport molaire est 17,95 g/l, et la productivité a été de 1,5 g/l/h. Le biocatalyseur a été utilisé à plusieurs reprises dans un

bioréacteur à lit fixe pour la synthèse de l'acide ascorbique glucoside et environ 17 g/l de l'acide ascorbique glucoside correspondant à une productivité volumétrique de 1,42 g/l/h a été obtenu dans chaque utilisation.

La conversion a été maintenue à 70% dans chaque utilisation. Le mycélium immobilisé a également montré une réutilisation exceptionnellement élevée et une stabilité de stockage. Le produit a été purifié par Chromatographie d'échange d'ions à 85% et par chromatographie sur gel perméable avec un rendement final de 75%. (Hsin-Ju Hsieh et al, 2007).

IV- Les bienfaits de la vitamine C sur la santé

La vitamine C est indispensable au corps humain quotidiennement requise pour au moins 300 fonctions métaboliques dans le corps humain. Parmi quelques bienfaits de cette molécule on peut citer :

- ✘ C'est un excellent réducteur, C'est pour cette raison qu'on lui accorde des propriétés antioxydantes qui présentent d'innombrables bienfaits sur l'ensemble de l'organisme. Par conséquent elle bloque la production de radicaux libres (Carr et al. 1999), elle protège les acides gras insaturés de la membrane des cellules et agit directement à l'intérieur des cellules et indirectement en régénérant la vitamine E, principal antioxydant de la membrane cellulaire.
- ✘ Joue un rôle important dans la formation du collagène (maintient le tonus de tous les organes et notamment de la peau et des vaisseaux sanguins) (Guy, 2005).
- ✘ Elle intervient dans la conversion du cholestérol en acides biliaires. Il faut savoir que cette conversion est la principale voie utilisée par l'organisme pour se débarrasser du cholestérol en excès. On connaît mal son mode d'action, mais il existe une relation étroite entre la quantité de vitamine C présente dans le foie et la rapidité avec laquelle ce dernier transforme le cholestérol en acides biliaires (Jacques, 1995 ; Fotherby, 2000).
- ✘ Les chercheurs au Trinity College de Dublin en Irlande ont estimé que les radicaux libres induisent des dommages de l'ADN, qui pourraient déclencher des mutations cancérogènes dans la muqueuse colique. La vitamine C supprime ces dommages et

limitent la croissance des polypes adénomateux chez les patients atteints de cancer colorectal.

- ✘ La vitamine C réduit le taux de mortalité due aux maladies cardio-vasculaires de 45%(Pincemail et Al , 1998).
- ✘ La vitamine C aide à réguler l'insuline chez les diabétiques (Kelly, 1998 ; Mayne, 2003 ; Tak et Al., 2000 ; Goodyear-Bruch et Pierce, 2002).
- ✘ La vitamine C est un puissant détoxifiant, notamment hépatique mais aussi au niveau de toutes les cellules qu'elle protège contre les radicaux libres, elle renforce les défenses immunitaires, améliore la résistance aux infections virales et microbiennes au niveau de tous les organes (Guy, 2005).
- ✘ Cependant, les études montrent de façon constante que la vitamine c aide à réduire la durée d'un rhume et l'intensité. Suppléments de vitamine C à doses thérapeutiques (1 à 8 grammes / jour) à l'apparition d'un rhume peut réduire la durée des épisodes de froid par autant que 48%.
- ✘ A partir d'un certain âge, les maladies oculaires liées au vieillissement augmentent chez les hommes et les femmes, en raison de l'effet nocif des radicaux libres. Les radicaux libres apparaissent lorsque l'oxygène et la lumière (tous deux largement présents dans les yeux) se rencontrent. Ils accélèrent le vieillissement cellulaire et provoquent, d'une manière générale, des dommages cellulaires s'ils ne sont pas neutralisés. S'ils causent une opacification du cristallin, par exemple, ils peuvent aboutir à une cataracte. La vitamine C fait partie des principaux antioxydants dans le cristallin. Elle y est environ 60 fois plus concentrée que dans le plasma. La vitamine C neutralise les radicaux libres apparus dans l'œil sous l'effet de la lumière du soleil et empêche ainsi la dégradation des protéines sensibles du cristallin. Celles-ci devant durer toute la vie, la protection contre les rayons UV et un apport suffisant en vitamine C sont très importants (Priska, 2009).

V- Présentation des aliments étudiés

V-1. Persil

Tableau 3 : Carte d'identité du persil.



Nom latin	<i>Petroselinum Crispum</i> <i>Napolitanum</i>
Nom français	Persil
Noms communs	Persil Plat, Persil de Naples, Italian Parsley, Flat Parsley
Nom rabe	البقدونس
Nom anglais	Parslay

Le persil est très répandu dans tout l'hémisphère Nord où son usage est généralisé. Le persil frais est une source de vitamine C.

En cuisine, on utilise surtout les feuilles hachées en décoration de pratiquement tous les plats salés. Les graines sont également condimentaires ainsi que les racines du persil hollandais ou du persil de Hambourg. Ajouté à l'ail, il devient persillade et il ralentit le rancissement de celui-ci grâce au pouvoir antioxydant de la vitamine C.

Le persil est diurétique, dépuratif et sudorifique, il faut toutefois se méfier car il peut être dangereux à fortes doses, il est aussi déconseillé pendant la grossesse (Jean-Paul Collaert, 2002).

V-2. Poivron rouge

Tableau 4 : Carte d'identité du poivron rouge.



Nom latin	<i>Capsicum annum</i>
Nom français	Poivron rouge
Noms communs	Poivron, corail des jardins, piment d'eau, piment d'Espagne, piment doux, piment à gros fruits, poivre d'Espagne, poivre d'Inde, poivre rouge, poivre du Portugal
Nom rabe	فلفل أحمر
Nom anglais	Red Pepper

Poivrons rouges constituent une source impressionnante de la vitamine C, A et de lycopène qui constitue, à côté de la vitamine C l'un des meilleurs antioxydants, capable de décontaminer le corps et le libérer de l'influence négative de la radicaux libre, étant l'un des plus importants de détoxifiants des produits comestibles.

VI- Méthodes d'extraction de la vitamine c

L'extraction de la vitamine C à partir d'une matière qui contient ce composé chimique doit se faire avec des méthodes fines et précises car elle se dégrade facilement par oxydation enzymatique aérobie, chauffage ou exposition à la lumière. La forme oxydée reste néanmoins physiologiquement active.

VI-1.Extraction sous vide assistée par micro-ondes

Parmi les technologies d'extraction les plus prometteuses, l'extraction par microondes, est l'une des méthodes les plus récentes pour l'extraction de molécules d'intérêt avec un impact environnemental positif : moins d'énergie, de solvants et des eaux usées. En effet, depuis 1960, cette technologie est bien implantée dans des domaines variés comme la synthèse organique (Loones et Al., 2005 ; Loupy, 2006), l'analyse des moisissures (Luthria, 2004), l'environnement (Clark, 2002 ; Zhang, 2006), l'agroalimentaire (Lau et Tang, 2002 ; Chiavaro, 2010), le séchage (Abbasi Souraki et Mowla, 2008), la médecine (Lantis, 1998) et l'extraction (Franke, 1996 ; Loupy, 2006). Les premiers travaux utilisant les micro-ondes pour extraire des composés organiques ont été publiés en 1986. Depuis cette date, les micro-ondes sont de plus en plus utilisés dans le domaine de l'extraction des produits végétaux dont les trois principaux procédés sont: l'extraction par solvant assistée par micro-ondes « MAE » (Ganzler, 1986), l'hydrodistillation par micro-ondes sous vide pulsé « VMHD » (Mengal et Mompon, 1996) et l'hydrodiffusion assistée par micro-ondes « MHG » (Chemat et al., 2008). Ainsi, grâce à un chauffage volumique et sélectif, la technologie de l'extraction par micro-onde paraît être une alternative intéressante puisqu'elle autorise l'utilisation réduite de solvant, des temps de traitement plus courts, des rendements plus élevés et une meilleure sélectivité.

Les avantages sont multiples, essentiellement:

- ✘ **La rapidité de l'extraction** : Dans la majorité des articles étudiés (Lucchesi, 2006), le paramètre le plus valorisé est incontestablement le temps d'extraction. Alors que l'ordre de grandeur temporel des extractions assistées par micro-ondes est en général la seconde voire tout au plus la minute.
- ✘ **Le choix du solvant** : Les solvants les plus utilisés en extraction par micro-ondes sont l'hexane, le toluène, le tétrachlorure de carbone, le dichlorométhane et l'éthanol. Le choix du solvant va définir le type de chauffage. Si le solvant est transparent aux micro-ondes, c'est-à-dire s'il possède une permittivité ϵ' faible, c'est directement le

matériel végétal qui captera le rayonnement micro-ondes. En revanche, si le solvant absorbe les micro-ondes (ϵ' élevé), le chauffage sera plutôt un chauffage de type conductif: les micro-ondes vont permettre le chauffage du solvant et ce dernier par conduction chauffera le matériel végétal. Le choix du solvant va donc déterminer le type de chauffage et par conséquent le mécanisme d'extraction et la composition du produit final (Lucchesi, 2006). D'après Spiro et Chen (1995), lors de l'extraction des constituants aromatiques des feuilles de menthe poivrée, l'utilisation de l'hexane (solvant apolaire, et transparent aux micro-ondes) comme solvant d'extraction donne des résultats exceptionnellement élevés pour les concentrations en 1,8-cinéole, menthone et menthol. De plus, l'observation au Microscope Electronique à Balayage (MEB), a révélé la rupture d'un grand nombre de glandes sécrétrices contrairement aux autres extractions où les glandes sont déformées ou endommagées mais où aucune rupture n'est notée.

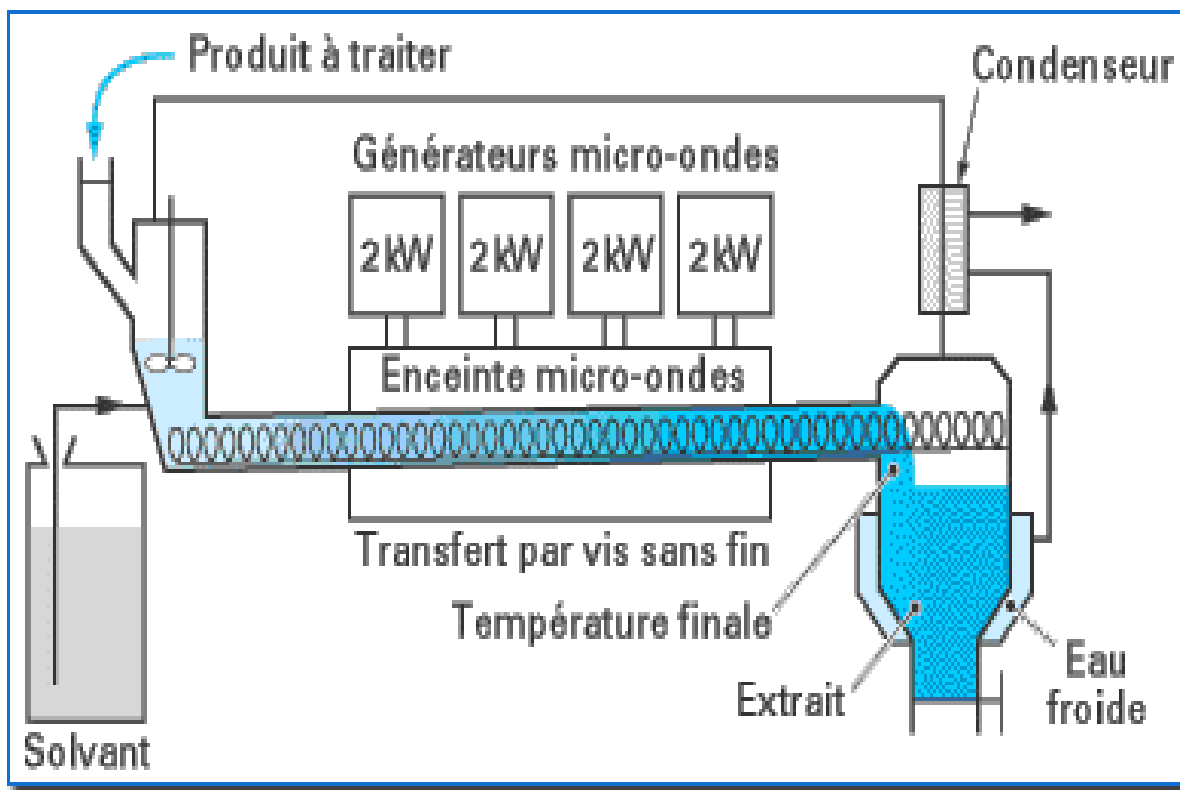


Figure 12 : *Outil pilote d'Extraction par Solvant Assisté par Micro ondes en continu*
(Paré et Al., 1990).

VI-2. Extraction par l'acide métaphosphorique

Empêche l'oxydation et la dégradation de la vitamine C, en plus de l'extraire, offre une sensibilité suffisante et la sélectivité dans l'extraction. Le tout débute par une extraction par l'acide métaphosphorique HPO_3 (Yildiz, 2008).

VII- Méthodes d'analyse de la vitamine c

VII-1. Dosages directs de la vitamine C

VII-1-1. Méthodes électrochimique

VII-1-1-1. Méthode

spectroscopique

La vitamine C présente un spectre d'absorption en solution aqueuse avec maximum vers 2,650 Å. Cette technique nécessite l'utilisation d'un bon spectrophotomètre, des solutions relativement pures d'acide ascorbique et une concentration assez élevée pour obtenir des résultats lisibles. En outre, dans les milieux biologiques complexes qui sont associés à la vitamine C, de nombreuses causes d'erreur viendront s'ajouter au dosage proprement dit, par suite de la présence d'impuretés ayant des propriétés absorbantes notables vers 2.650 Å (Hossu, 2006).

VII-1-1-2. Méthode

polarographique

Basée sur les propriétés oxydo-réductrices de la molécule d'acide ascorbique. La méthode polarographique exige un matériel coûteux, elle ne s'applique bien qu'aux jus de fruits, les autres extraits de plantes contenant des substances interférentes qui perturbent le dosage (Gillam, 1945).

VII-1-2. Les méthodes fluorométriques

Elles consistent, après oxydation de l'acide L-ascorbique en acide déhydro L-ascorbique, à transformer ce dernier en un produit fluorescent par l'intermédiaire de l'orthophénylènediamine. La méthode à l'orthophénylènediamine a été retenue par l'Association Française de Normalisation (AFNOR, 1980) pour le dosage de la vitamine C dans les jus de fruits et légumes et constitue la méthode officielle de l'AOAC (1984) pour le dosage de la vitamine C dans les préparations vitaminées.

Si Tono et Fujita (1982) ont utilisé l'ascorbate oxydase comme réactif d'oxydation, la plupart des auteurs utilisent le charbon actif (Deutsch et Weeks, 1965 ; Roy et al., 1976 ; Egbergr, 1977 ; Dunmire et al., 1979 ; Devries, 1983 ; Visser, 1984). Cette méthode qui

peut-être partiellement automatisée (Devries, 1983) est très sensible et possède une assez bonne spécificité.

VII-1-3. Les méthodes photométriques

Le réactif le plus fréquemment utilisé est un sel de tétrazolium qui, en présence d'acide l'ascorbique, donne un composé qui absorbe dans le domaine visible à une longueur d'onde maximale de 578 nm (Lehnard, 1978; Deneke et al., 1978; Vasileva et Neicheva, 1979; Beutler et Beistingl, 1980 ; List et Knechtel, 1980; Kelly et Latzko, 1980 ; Henniger, 1981 ; Arakawa et al., 1981a ; Tono, 1981 ; Fujita, 1985). D'autres réactifs ont également été proposés: la N-bromosuccinillide (Lehnard, 1981), le complexe Cu (II)- biquinolone-2,2' (Arakawa et al., 1981b), le molybdate d'ammonium (Bajaj et Kaur, 1981) et la diméthoxyquinone-4,4' (Hamann, 1976 ; Kamangar et al., 1977).

Une méthode cinétique a été étudiée (Hiromi et al., 1977, 1980 ; Obata et al., 1979, 1982) . Ces auteurs ont montré qu'en présence d'un excès d'acide L-ascorbique, la constante de vitesse apparente de la réaction de réduction du dichloro-2,6 phénol indophénol était proportionnelle à la concentration en acide L-ascorbique.

On constate que les inconvénients pour les méthodes photométriques sont les mêmes que les méthodes titrimétriques; une spécificité incertaine et l'impossibilité de doser simplement la vitamine C totale.

Boehringer a commercialisé une méthode (utilisant le sel de tétrazolium) dans laquelle l'acide déhydro L-ascorbique, dans une étape préliminaire, est réduit en acide L-ascorbique par la DL-homocystéine, permettant ainsi un dosage global de la vitamine C (Boehringer, 1980).

VII-1-4. Méthodes de titration

De nombreuses techniques de dosage de la vitamine C ont été décrites font appel aux propriétés oxydo-réductrices de l'acide ascorbique sur des colorants appropriés, d'autres plus spécifiques sont des réactions colorées de la molécule avec des copulateurs choisis.

VII-1-4-1. Titration

directe à l'iode

Simple dosage iodométrique classique, cette méthode n'est applicable qu'à des produits purs (préparations pharmaceutiques) et ne dose que l'acide ascorbique réduit (Kolthoff et Sandel, 1936).

VII-1-4-2. Titration par

bleu de méthylène

Excellente méthode clinique par sa rapidité et sa simplicité, elle paraît insuffisante en pratique dans le cas de la présence de réductones et parce qu'elle ne touche qu'à l'acide ascorbique réduit.

Utilise les propriétés photoréductrices de l'acide ascorbique sur le bleu de méthylène qui est transformé en leuco dérivé et ceci quantitativement (Martini et Bonsignore, 1934).

VII-1-4-3. Titration par

2-6 Dichlorophénol indophénol

La méthode de titration directe est sensible à de nombreuses substances réductrices ; de plus, basée comme la technique précédente sur les propriétés oxydantes de l'acide ascorbique réduit, elle ne donne aucun renseignement sur les formes oxydées de ce dernier, à moins de passer par des artifices successifs d'oxydation puis de réduction complète (Tilimans, 1927).

Cette méthode avec détection potentiométrique du point d'équivalence est la méthode officielle de dosage de l'acide L-ascorbique dans les aliments de l'Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1984). Bien qu'elle soit sujet de nombreuses interférences, elle est encore largement utilisée (Steele et al., 1976; Bunton et al., 1979; Tonelli et al., 1980; Bohrer et al., 1984).

VII-1-4-4. Titration

électrométrique au 2-6 dichlorophénol indophénol

Cette méthode est une variante de la méthode directe, le point de virage étant détecté à l'électro-titrimètre. Cette méthode présente l'avantage sur la précédente de pouvoir opérer dans les milieux troubles ; les inconvénients seront les mêmes que ceux de la technique directe (Harris et Wang, 1942).

VII-1-4-5. Méthode à

l'indophénoxyène

On opère une décoloration d'un excès de 2-6 dichlorophénol indophénol par l'acide ascorbique réduit. Mais au lieu de mesurer directement la quantité de colorant réduit par titrimétrie, on extrait le colorant avec du xylène et on mesure photométriquement l'excès de colorant non réduit (Robinson et Stotz, 1945).

2-4 Dinitro-Phenyl Hydrazine

Le dérivé que donne la 2-4 dinitro-phényl hydrazone de l'acide déhydro-ascorbique avec SO_4H_2 à 85 % présente une coloration rouge dont les maximas d'absorption sont à 500-550 μm et 350-380 μm (Kuether, 1943 ; Oesterling, 1944 ; Ming, 1947).

L'acide ascorbique ne donne pas cette réaction. Mais son oxydation quantitative sur Norit le transforme en acide déhydroascorbique qui réagit sur la 2-4 dinitro-phényl hydrazine.

Nous possédons donc là une technique capable de donner successivement les valeurs de l'acide déhydro-ascorbique, de l'acide ascorbique réduit et de l'acide ascorbique total, par une simple oxydation en cours d'analyse.

VII-1-5.Méthodes biochimiques

C'est une méthode enzymatique basée sur l'oxydation préférentielle de l'acide ascorbique par l'acide ascorbique oxydase. Cette méthode n'était pas spécifique (Tauber et Kleiner, 1935).

VII-2. Dosage de la vitamine C après l'avoir isolée de son substrat*VII-2-1.Méthode de l'isotachophorèse*

Elle a permis de isoler et de doser l'acide L-ascorbique dans les jus d'orange et les yaourts au citron (Baldesten et al., 1978), dans les concentrés de citron (Rubach et Breyer, 1980) et dans les tomates (Tsuda et Fukuda, 1986). Cette technique de séparation est assez rapide (dix minutes) et son taux de recouvrement est satisfaisant (97 %). Cependant l'acide déhydro L-ascorbique non chargé ne se déplacera pas sous l'influence d'un champ électrique. Il est donc nécessaire de le réduire au préalable en acide L-ascorbique si l'on veut réaliser un dosage global de la vitamine C.

VII-2-2. Méthode de la chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse est certainement une méthode de séparation très efficace. Malheureusement l'acide L-ascorbique est détruit avant de l'être vaporisé. Il est donc nécessaire dans un premier temps de préparer un dérivé volatil. Manso (1980) a eu recours à la silylation de l'acide L-ascorbique préalablement oxydé en acide déhydro L-ascorbique. Ce dérivé est isolé sur une colonne de type silicone et détecté par ionisation de flamme. Cette technique a donné de bons résultats pour le dosage de la vitamine C totale dans la farine de blé, mais l'auteur, étant donné la complexité de la méthode, lui préfère la chromatographie en phase liquide haute performance.

VII-2-3. Méthode de la chromatographie en couches minces

C'est une technique qui permet le dosage de la vitamine C totale. Elle a été préconisée par la Communauté Economique Européenne pour le dosage de la vitamine C dans les aliments pour animaux (CEE, 1981). L'acide L-ascorbique est oxydé par l'iode et l'acide déhydro L-ascorbique. Ce dernier réagit avec la dinitro-2,4 phénylhydrazine pour donner une bis dinitro-2,4 phénylhydrazone qui est isolée par chromatographie en couches minces sur gel de silice, puis solubilisée en milieu acétique. Ce composé coloré est dosé par absorption à 500 nm. C'est la même méthode qui a permis à Jerumanis et Clerk (1977) de déterminer la vitamine C dans la bière. Matthiessen (1978), Hoppe et al (1979) et Manso (1980) ont préféré utiliser la densitométrie pour doser la bis dinitro-2,4 phénylhydrazone isolée par chromatographie en couches minces.

VII-2-4. Méthode de la chromatographie sur gel (Méthode de Bourgeois)

L'acide L-ascorbique est extrait de l'échantillon par une solution diacide métaphosphorique. Cet extrait est déposé sur une colonne de Séphadex anionique, ce qui a pour effet de fixer l'acide L-ascorbique sur le gel. Après lavage à l'eau, l'acide L-ascorbique est oxydé en acide déhydro L-ascorbique par une solution de parabenzoquinone, qui servira également à éluer le composé formé. L'éluat obtenu est traité par une solution de nitro-4 phénylènediamine-1,2. La coloration jaune donnée par cette réaction est mesurée colorimétriquement à 375 nm (Bourgeois et Maingy, 1975).

Cette technique permet aussi le dosage de l'acide déhydro L-ascorbique initialement contenu dans l'échantillon en réduisant préalablement ce composé en acide L-ascorbique par action du dimercapto-2,3 propanol-1.

VII-2-5. Méthode de la chromatographie en phase liquide haute performance

Parmi les différentes méthodes permettant d'isoler la vitamine C de son substrat, c'est la chromatographie en phase liquide haute performance qui, de très loin, a fait l'objet du plus grand nombre de publications depuis une dizaine d'années. Malheureusement les auteurs se sont souvent contentés de doser uniquement l'acide L-ascorbique. Pachla et Kissinger (1976), Carr et Neff (1980), Vezey et Nieman (1980), Floridi et al. (1982), Grun et Loewus (1983), Ashoor et al. (1984) et Rizzolo et al. (1984) ont utilisé une phase stationnaire échangeuse d'anions. Forts. Sood et al. (1976), Rueckemann (1980a), Augustin et al. (1981), Coustard et Sudrud (1981), Modelina et Flinks (1982) et Lam et al. (1984) ont eu recours à la chromatographie par appariement d'ions. La chromatographie sur support greffé en phase

inverse (Rueckemann, 1980b; Shaw et Wilsin, 1982 ; Watada, 1982) ainsi que la chromatographie sur échangeurs d'anions faibles (Carnevale, 1980; Lookhart et al., 1982) ont été aussi utilisées.

Cette dernière méthode a également été préconisée pour séparer l'acide L-ascorbique de son isomère optique, l'acide D-ascorbique (Archer, 1980 ; Bui NGuyin, 1980 ; Arakawa et al., 1980b ; Geigert et al., 1981 et Otsuka et al., 1981).

Si la séparation de l'acide L-ascorbique et de l'acide déhydro L-ascorbique ne pose pas de problème particulier, le dosage de l'acide déhydro L-ascorbique est beaucoup plus délicat et les travaux au cours desquels ce problème fut abordé sont en nombre beaucoup plus restreint.

L'acide L-ascorbique est généralement détecté par absorption ultraviolette ou par réaction électrochimique; or ces deux modes de détection ne sont pas utilisables pour l'acide déhydro L-ascorbique qui n'absorbe que dans le domaine ultraviolet lointain ($\lambda < 215$ nm) et qui n'est pas réducteur, d'où la difficulté de doser simultanément ces deux composés. Trois solutions sont possibles:

- ✘ procéder à une réduction préalable de l'acide déhydro L-ascorbique en acide L-ascorbique (Dennison et al., 1981; Donner et Hicks, 1981).
- ✘ utiliser un détecteur ultraviolet à $\lambda < 215$ nm (Finlay et Duang, 1981 ; Rose et Nahrwold, 1981; Wimalasiri et Wills, 1983 ; Bianchi et Rose, 1985).
- ✘ transformer l'acide déhydro L-ascorbique en un dérivé fluorescent avant l'élution (Keating et Haddad, 1982 ; Haddad et Lau, 1984 ; SPpeek et al., 1984 ; Kneiffel et Sommer, 1985), ou après l'élution (Vanderslice et Higgs, 1984 ; Kacem et al., 1986).



Chapitre 2:

Matériel et Méthodes

Matériel et Méthodes

I- Extraction de la vitamine C

I-1. Extraction solide/liquide

Elle permet d'extraire par solubilisation les composants solubles de matières végétales (persil, poivron rouge) à l'aide des solvants. Dans notre cas l'extraction de la vitamine C a été effectuée par des solvants (Eau, Ethanol/Eau et l'Acide métaphosphorique).

I-1-1. Extraction par l'eau et l'éthanol

Un gramme de matériel végétal a été broyé dans un mortier en présence de 100 ml de solvant à des concentrations croissantes en éthanol 0%, 40% et 60%. Puis, l'ensemble est porté sous agitation dans un bain marie à des températures différentes 40, 60, 80 °C pendant 6h. Après centrifugation à 5000 rpm pendant 10 minutes, le surnageant est récupéré pour le dosage.

I-1-2. Extraction par l'acide métaphosphorique

L'extraction au moyen de l'acide métaphosphorique a été réalisée selon le protocole décrit par Singh et al (2006). 1g de matériel végétale a été broyé dans un mortier en présence de 25 ml d'acide métaphosphorique pendant 45 min. cette opération pour une deuxième fois, l'extraction entière prend 90 minute. Les extraits ont été d'abord filtrés sur papier Wathman, puis analysés par dosage titrimétrique.

II- Titrage indirecte de la vitamine C par iodometrie

La méthode de titrage indirecte de la vitamine C par iodometrie a été décrite par plusieurs auteurs (Easton et Mack, 1980 ; Bucarest et Al., 1993 ; British, 1988 ; Christel Bertoldi, Mai 2006). La technique utilisée est celle du dosage rédox par retour. Un volume connu d'extraits des aliments est mis en présence d'une quantité connue de diiode en excès. La totalité de la vitamine C réagit avec le diiode en excès et le diiode restant est dosé par une solution de thiosulfate de sodium $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

II-2. Préparation des réactifs

II-2-1. Préparation de l'acide métaphosphorique

40 g d'acide métaphosphorique vitreux a été broyé dans un mortier et lavé, à eau distillée. L'acide métaphosphorique est par la suite dissous dans 200 ml d'eau distillée à on conserve au réfrigérateur 8 jours u maximum. La solution préparée est diluée au 1/10 juste avant l'emploi pour obtenir une solution à 20 g/l, on la conserve à +4°C.

II-2-2. Préparation de la solution diiode

Le protocole expérimental décrit par Derambure (2009) a été utilisé. Une solution d'iodure de Potassium trois fois plus concentré que la solution d'iode désirée a été préparée. Le mélange est agité magnétiquement, puis complété au volume souhaité.

Pour 1 litre d'eau distillée, 25g de KI a été dissout afin d'obtenir une solution de 12,02g d'I₂/l, cette solution est conservée dans une bouteille teintée.

II-2-3. Préparation de la solution de thiosulfate de sodium de concentration 5.10^{-3} mol/l

0,62 g de thiosulfate de sodium pentahydraté n de formule Na₂S₂O₃ ,5H₂O a été introduit dans 0,5 litre d'eau distillée.

On a $n=m/M$ et $n=c*v$ donc $m=n*M \Rightarrow m=c*v*M=2,5.10^{-3} *248,2$

m=0,62g

II.2.4. Préparation d'empois d'amidon à 5%

On pèse 1 g d'amidon, on le met en suspension dans 10 ml d'eau froide, puis on verse dans 90 ml d'eau bouillante, après on laisse bouillir 2 à 3 minutes.

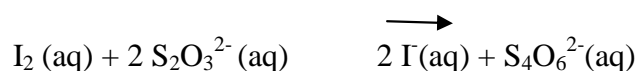
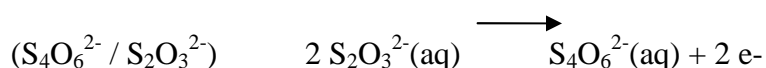
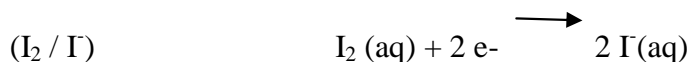
II-3. Protocole de dosage

II-3-1. Titrage préliminaire de l'iode

On Mesure précisément $V_2 = 10 \text{ ml}$ de solution de diode à la pipette jaugée et les verser dans un erlenmeyer, puis on remplit la burette graduée avec la solution de thiosulfate de sodium de concentration $C_3 = 5,0.10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$. Après Réglage du zéro de la burette, on ajoute lentement la solution de thiosulfate de sodium. Lorsque le mélange réactionnel devient jaune pâle, on ajoute quelques gouttes d'empois d'amidon. La solution prend alors une couleur noire, on continue à verser lentement la solution de thiosulfate de sodium jusqu'à la zone de virage : l'équivalence est alors atteinte. On repère et on note le volume à l'équivalence V_{3E} , On fait deux titrages concordants.

II-3-2. Calcul de la concentration de la solution de diiode C₂

1) On donne les couples:



2) A l'équivalence, les réactifs ont été mélangés dans les proportions stœchiométriques de l'équation de titrage:

$$n_{\text{init}}(I_2) = n_{\text{versée équivalence}}(S_2O_3^{2-}) / 2$$

$$C_2 \cdot V_2 = \frac{1}{2} \cdot C_3 \cdot V_{3E}$$

$$C_2 = \frac{1}{2} \cdot C_3 \cdot V_{3E} / V_2$$

II-3-3. Titrage indirecte de la vitamine C (Eau et Ethanol)

Dans un erlenmeyer, On introduit un volume $V_1 = 10$ ml de l'extrait de persil ou de poivron rouge, puis on ajoute quelques gouttes d'empois d'amidon, et un volume $V_2 = 15$ ml d'iode de concentration C_2 . La solution est alors noire, à cause de l'excès d'iode.

On remplit une burette graduée avec la solution de thiosulfate de sodium à $C_3 = 5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ et on titre la solution de diiode restant jusqu'à disparition complète de la coloration noire, puis on note le volume V'_{3E} de thiosulfate de sodium versé à l'équivalence, On fait deux titrages concordants.

N.B :

Pour les deux dosages, l'eau distillée est utilisée comme témoin.

On laisse la solution durant trois jours et on répète le dosage une autre fois.

II-3-4. Extraction par l'acide métaphosphorique

La vitamine C en solution est sensible à l'oxydation par l'oxygène de l'air (et à la lumière), il faut donc le protéger de l'air, d'où l'utilisation d'eau dégazée (privée d'oxygène). De plus l'oxydation est particulièrement sensible à chaud en milieu neutre ou alcalin. On ajoute donc souvent à la solution à doser de l'acide métaphosphorique (HPO_3).

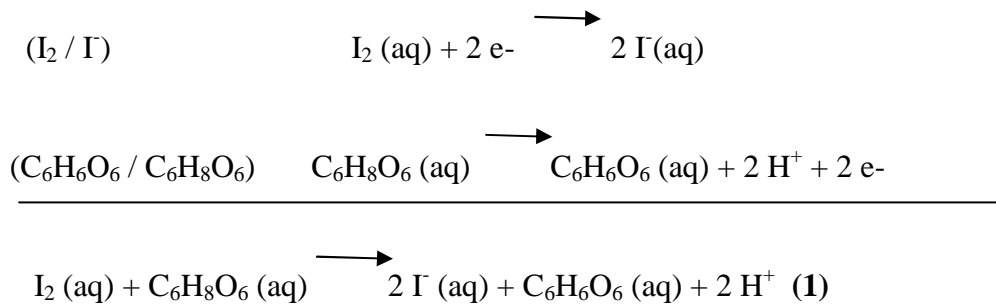
Tableau 1 : Les constituants de l'échantillon et le témoin à doser

	Témoin	Essai
Solution de d'iode (ml)	10	10
Acide métaphosphorique à 20 g/L	10	10
Eau distillée dégazée (ml)	15	10
Echantillon à doser (ml)	-	5
Thiodène	4 gouttes	4 gouttes

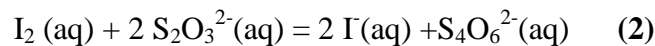
II-4. Calcul de la masse de vitamine C

On donne les couples:

- L'équation bilan de la réaction d'oxydoréduction entre (I_2 / I^-) et ($C_6H_6O_6 / C_6H_8O_6$):



- L'équation de la réaction entre I_2 et $S_2O_3^{2-}$:



- 1) On fait réagir toute la vitamine C contenue dans l'échantillon d'extrait du persil ou du poivron rouge avec un excès d'iode, puis on dose l'iode qui n'a pas réagi.

On a la relation entre: $n(I_2)_{total} = n(I_2)_{vit C} + n(I_2)_{restant}$

- 2) De l'équation (1) on a: $n_1(C_6H_8O_6) = n(I_2)_{vitC}$

De l'équation (2) on a: $n(I_2)_{restant} = n_{eq}(S_2O_3^{2-}) / 2$

On en déduit la relation entre:

$$n(I_2) \text{ total} = n_1(C_6H_8O_6) + n_{eq}(S_2O_3^{2-}) / 2$$

Soit:
$$n_1(C_6H_8O_6) = n(I_2) \text{ total} - n_{eq}(S_2O_3^{2-}) / 2$$

3) La quantité n_1 de vitamine C pour le volume $V_1 = 10,0$ ml des extraits:

$$n_1(C_6H_8O_6) = n(I_2) \text{ total} - n_{eq}(S_2O_3^{2-}) / 2$$

$$n_1(C_6H_8O_6) = C_2 \cdot V_2 - C_3 \cdot V_{3,E} / 2$$

4) La quantité n_0 de vitamine C pour le volume $V_0 = 100$ ml d'extrait de persil et poivron rouge :

$$n_0 = n_1 \cdot (V_0 / V_1)$$

5) La masse de la vitamine C, en g, dans la totalité d'extrait de persil ou poivron rouge est:

$m = n_0 \cdot M$

II-5. Confirmation de la méthode de dosage

Pour confirmer notre méthode, on a effectué un dosage de la vitamine c dans un comprimé de quantité de vitamine c connu (60 mg).

A l'aide d'un mortier et d'un pilon, On broya un comprimé de vitamine C à notre disposition, après on dissous ce comprimé afin d'obtenir 500,0 ml d'une solution aqueuse que l'on notera S par la suite. Dans un erlenmeyer de 150 ml, on introduit 5,0 ml de la solution S puis on y ajoute 10,0 ml de la solution d'iode .l'excès d'iode est titré à l'aide de la solution de thiosulfate de sodium utilisée précédemment. On notera VE le volume versé à l'équivalence.

III- Production de la vitamine C par bioconversion à partir du glucose par le champignon « *BGF* »

III-1. Matériel biologique

Le Laboratoire de Biotechnologie de la Faculté des Sciences Dhar El Mahraz dispose d'une banque de souches dont *BGF*.

II-2. Préparation des milieux de culture

Avant d'entreprendre la préparation du milieu de culture, il faut pesée les différents constituants, puis les dissoudre complètement dans des erlenmeyers. Bouchés par du coton cardé (recouvert de papier aluminium), les erlenmeyers sont portés à autoclavage à 120 °C /20 minutes sous une pression d'environ 1 bar. On travail toujours dans des conditions stérile.

III-3. Milieu de pré culture

Un milieu de culture liquide (tableau 2) est inoculé par *BGF*, puis incubé à 30°C dans un shaker pendant trois jours.

Tableau 2 : Composition du milieu de culture de *BGF*.

Composition du milieu de culture	La masse des produits en g par litre d'eau distillé
Extrait de malt	3g

Glucose	10g
Extrait de levure	3g
Peptone	5g

III-4. Composition du Milieu de bioconversion

Tableau 3 : *Composition du Milieu de bioconversion de culture de BGF.*

Composition du milieu de culture	La masse des produits en g dans un litre d'eau distillé
Extrait de levure	6,6 g
Glucose	4,5g
K₂HPO₄	0,05 g

III-5. Préparation du stock

On prépare 40% glycérole (400 µl), et 60% Milieu de pré culture (600 µl), puis On met le mélange dans des tubes à -20°C.

III-6. Repiquage

Avec l'ensemencement, prendre une petite quantité de milieu sur lequel s'est développé le champignon et le déposer délicatement sur le nouveau milieu toujours on travail dans des conditions stériles, Il est préférable de prélever l'échantillon en périphérie où la croissance du champignon est active, on Referme les boîtes avec le film, puis on les Incube à 30°C pendant 3 jours.

III-7. Purification de la souche

Le repiquage consiste à transférer aseptiquement cette souche identifiée sur un milieu stérile gélosé l'agar agar pour l'isoler et la maintenir en culture pure.

III-8. Production de la vitamine C (la bioconversion)

On met 20 ml milieu de pré culture dans 500ml milieu de composition, on Centrifuge pendant 10 min à 6000 rpm, puis on a fait une extraction avec l'acide métaphosphorique, après on a suivie une cinétique de 24h.

Pour savoir est ce que notre *BGF* a produit de la vitamine c, on a fait deux dosages : un titrimétrique et l'autre dosage du glucose par la méthode de DNS. Apres on Calcule la concentration de la vitamine c et du glucose.

Remarque :

→ **Témoin négatif** : Eau

Milieu de composition sans souche

Le glucose

→ **Témoin positif** : Milieu de composition avec la souche

III-9. Méthode de dosage colorimétrique du glucose par le DNS (acide 3-5dinitrosalicylique)

III-9-1. Préparation du réactif de DNS (acide 3,5 dinitro-salicylique)

On dissout 9.84 g de DNS dans l'eau distillée en chauffant (éventuellement) modérément, puis on ajoute 300 g de tartrate double de Na et K dissous dans un peu d'eau distillée, après on dissout en agitant continuellement le précipité sec qui se forme en ajoutant 400 g/L de Lessive de soude (40 ml), on ajuster alors à 1L avec l'eau distillée dans un flacon brun.

III-9-2. Préparation de la gamme d'étalonnage

On réalise une solution de glucose à 2 g/L avec 0,2 g de glucose dans un volume de 100 ml. Puis la gamme d'étalonnage est réalisée grâce à cette solution étalon de glucose.

Dans une série de tubes on introduit 0 - 0,3 - 0,6 - 0,9 - 1,2 - 1,5 ml de solution de glucose à 2g/l , on ajuster chaque tube à 3 ml avec de l'eau distillée , puis on ajoute 2 ml de réactif 3-5 DNS , On mélange et on bouche les tubes avec du coton cardé et du papier aluminium , après on porte au bain marie à 100 °C pendant 5 min exactement .

On refroidit dans un bain d'eau froide et on ajoute 15 ml d'eau distillée dans chaque tube (on suppose que l'évaporation est la même pour chaque tube), on homogénéise et on laisse reposer pendant 15 min.

Lire les absorbances à 540 nm contre le blanc (tube n° 0).

Calcul de la concentration du glucose :

$$C_i.V_i = C_f.V_f$$

$C_f = C_i.V_i/V_f$

IV- Activité antioxydant de la vitamine C

L'activité antioxydante a été déterminée par la méthode β -Carotène–linoleate bleaching assay (Veliogly et al., 1998), en utilisant le BHT (butyle hydroxytoluène) comme standard.

Dans cette analyse la capacité anti-oxydante est déterminée par la mesure de l'inhibition des composés organiques volatils et les hydro-péroxydes conjugués diène résultant de l'oxydation de l'acide linoléique (Tepe et al., 2006).

IV-1. Préparation de la solution β -carotène/acide linoléique

Dans un ballon en verre pyrex de 100 ml, nous avons mélangé 2 mg de β -Carotène avec 10 ml de chloroforme, 20 mg d'acide linoléique et 200 mg de Tween 20. Le mélange est ensuite homogénéisé puis évaporé dans un Rotavapeur afin d'éliminer le chloroforme. Après évaporation, 50 ml d'eau distillée a été rajoutée au mélange, puis celui-ci est agité vigoureusement afin de former une émulsion (A).

IV-2. Essai au β -Carotène–linoleate bleaching

Dans des tubes contenant 5 ml de l'émulsion (A), la quantité suffisante d'extrait ou de BHT est ajoutée afin d'obtenir une concentration finale de 40 mg/l en polyphénols. Le tube contrôle contient 0.2 ml d'eau distillé et 5 ml de l'émulsion β -carotène/acide linoléique.

Une seconde émulsion (B), a été préparée afin de régler le 0 du spectrophotomètre. Ainsi, 20 mg de l'acide linoléique a été mélangé à 100 mg de tween 20 et 50 ml d'eau distillée. 0,2 ml d'eau distillée additionné à 5 ml de cette émulsion (B) a servi comme blanc pour régler le zéro de l'appareil.

La lecture de l'absorbance à 470 nm est effectuée immédiatement après l'addition des échantillons, puis les tubes sont placés dans un bain marie à 50°C. L'absorbance est lue chaque 20 min pendant 120 min.

IV-3. Préparation des échantillons

Pour le persil et le poivron rouge, on pèse 1g par 100 ml d'acide métaphosphorique.

Pour le Comprimé de vitamine C, on pèse 1g par 100 ml d'eau distillé.

Pour le BHT, on pèse 1g par 100 ml d'éthanol.

Témoin : Eau distillé.

IV-4. Expression des résultats

Le coefficient d'activité antioxydante AC est donné par la formule suivante :

$$AA = (A_{\text{antiox 120}} - A_{\text{témoin 120}}) / (A_{\text{antiox 0}} - A_{\text{témoin 120}}).$$

Avec respectivement $A_{\text{antiox 0}}$ et $A_{\text{antiox 120}}$, les absorbances de la solution en présence d'antioxydant à 0 et 120 min et $A_{\text{témoin 120}}$, l'absorbance de la solution sans antioxydant à 120 min



I- Optimisation de l'extraction de la vitamineC

Le protocole expérimental suivi pour la détermination de la teneur en vitamine C du persil et du poivron rouge a été vérifié par le dosage de celui-ci dans un comprimé commercial de concentration connue.

I-1. Optimisation des rapports de solvants d'extraction

L'optimisation des rapports de solvants a pour but de chercher la meilleur teneur en vitamine C en fonction du choix du solvant.

Cette partie porte sur l'étude de l'effet de la variation des rapports eau/éthanol sur la teneur en vitamine C des différents extraits. Les différents rapports eau/éthanol choisis sont respectivement 40/60,60/40, 100% d'eau et une extraction menée par l'acide métaphosphorique. On prend le temps maximal pour les différents solvants et la température qui donne le meilleur rendement pour le mélange eau/éthanol.

I-1-1. L'extraction du persil à partir des solvants différents

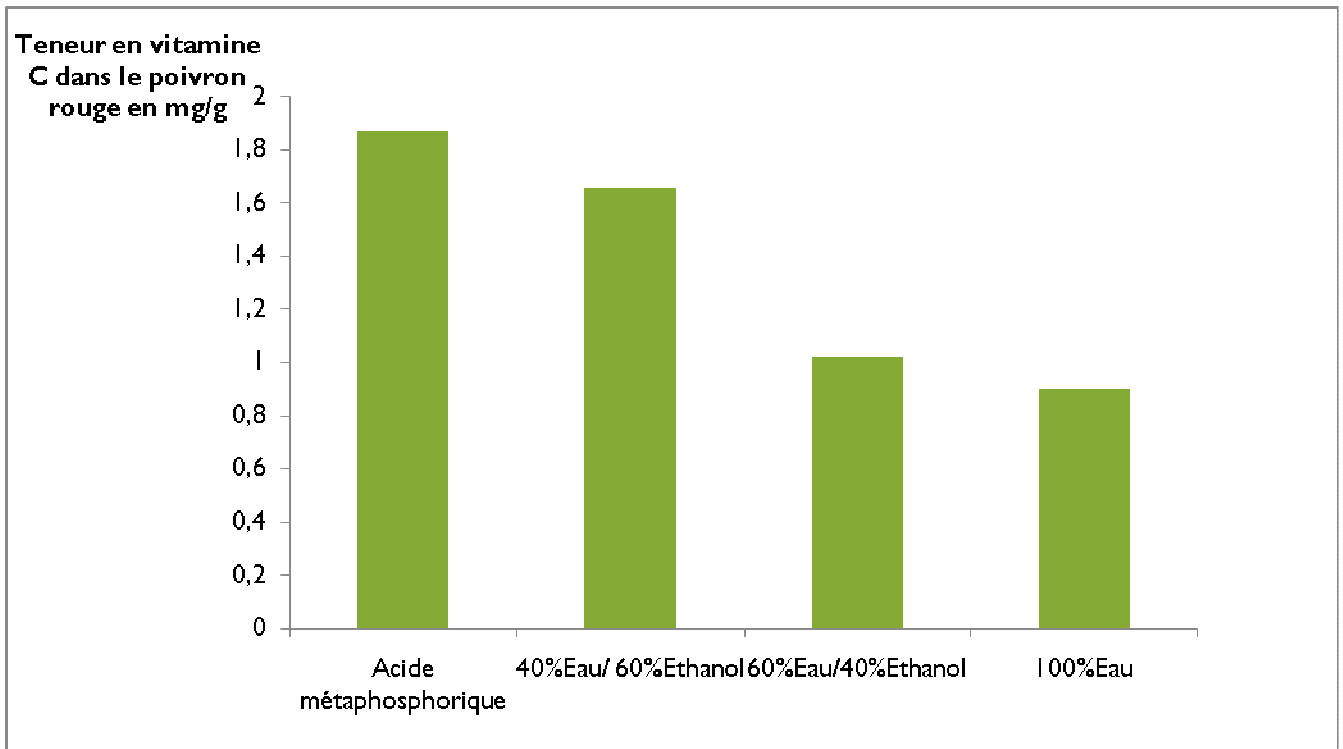


Figure 1 : *variation de la teneur en vitamine C de l'extrait du persil en fonction du solvant d'extraction.*

I-1-2. L'extraction du poivron rouge à partir des solvants différents

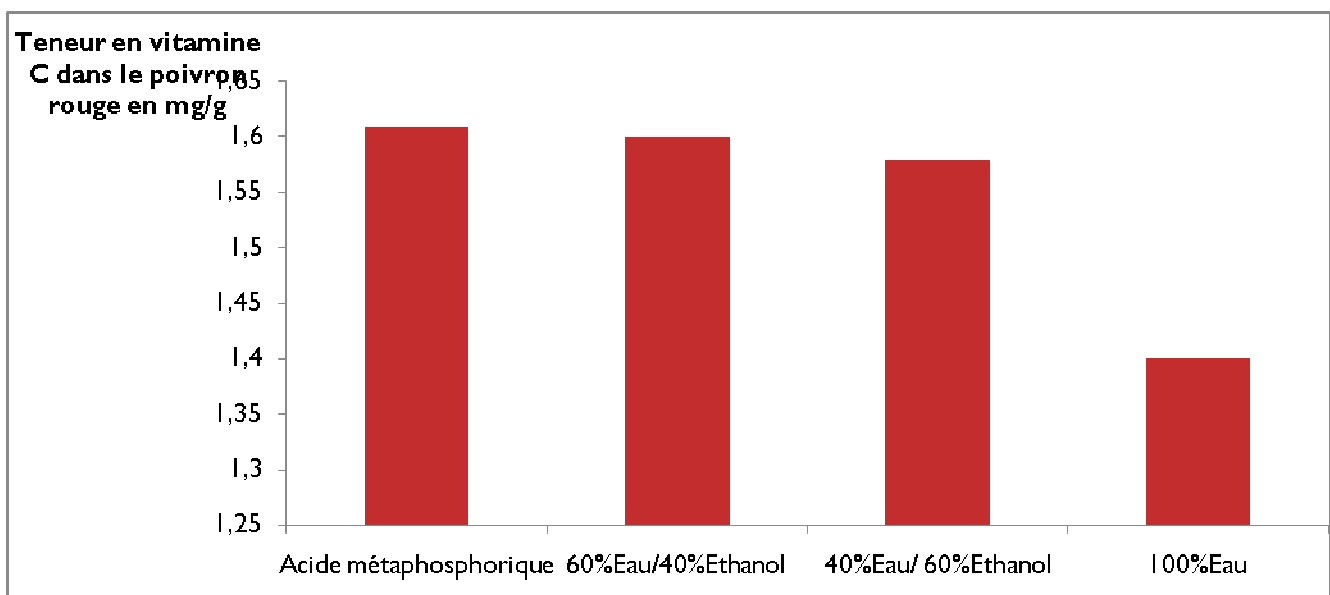


Figure 2 : *Teneur en vitamine C à partir d'extrait du poivron rouge c en fonction du choix des solvants.*

Les résultats schématisés sur les figures 5 et 6 montrent clairement que les teneurs en vitamine C du persil et du poivron rouge sont élevées en utilisant l'acide métaphosphorique comme solvant d'extraction. Des valeurs de l'ordre de 1,87 mg/g et 1,61 mg/g ont été notés pour le persil et le poivron rouge respectivement.

La diminution de la concentration de l'acide ascorbique a été remarquable avec les trois rapports eau/éthanol utilisés pour l'extraction. Or, la chute significative a été observée pour l'extrait aqueux, où on a observé une concentration de 0,9mg/g pour le poivron rouge et le persil.

Cette étude nous a permis de conclure que le meilleur solvant pour extraire la vitamine C à partir du persil et du poivron rouge est l'acide métaphosphorique HPO_3 et ceci est en concordance avec les résultats de Yurena et al. (2005) et Abushita et al. (1997).

L'acide métaphosphorique sert à maintenir le milieu acide de qui ralentie l'oxydation de l'acide ascorbique par l'oxygène et sa stabilisation sous sa forme réduite. Il empêche la dégradation de la vitamine C, en plus de l'extraire (Yurena et al., 2005 ; Abushita et al., 1997) (on peut ainsi doser la vitamine sans être gêné par la pulpe). Il a un rôle protecteur de la vitamine C. cependant l'eau et l'éthanol sont deux solvants polaires classiques, non-toxique et largement utilisés, La vitamine c est facilement soluble dans ces deux solvant avec une réaction faiblement acide. Bien que le rendement d'extraction par l'éthanol est plus faible que celle par l'acide métaphosphorique, ce mode d'extraction est avantageux car la vitamine C ainsi obtenue par cette méthode pourrait être considérée naturelle et même bio.

I-2. Optimisation de la température

L'optimisation de la température a pour but de chercher la grande quantité en vitamine C obtenue en fonction de la température.

I-2-1. L'extraction du persil par le mélange eau/ éthanol à différentes températures 40, 60, 80°C

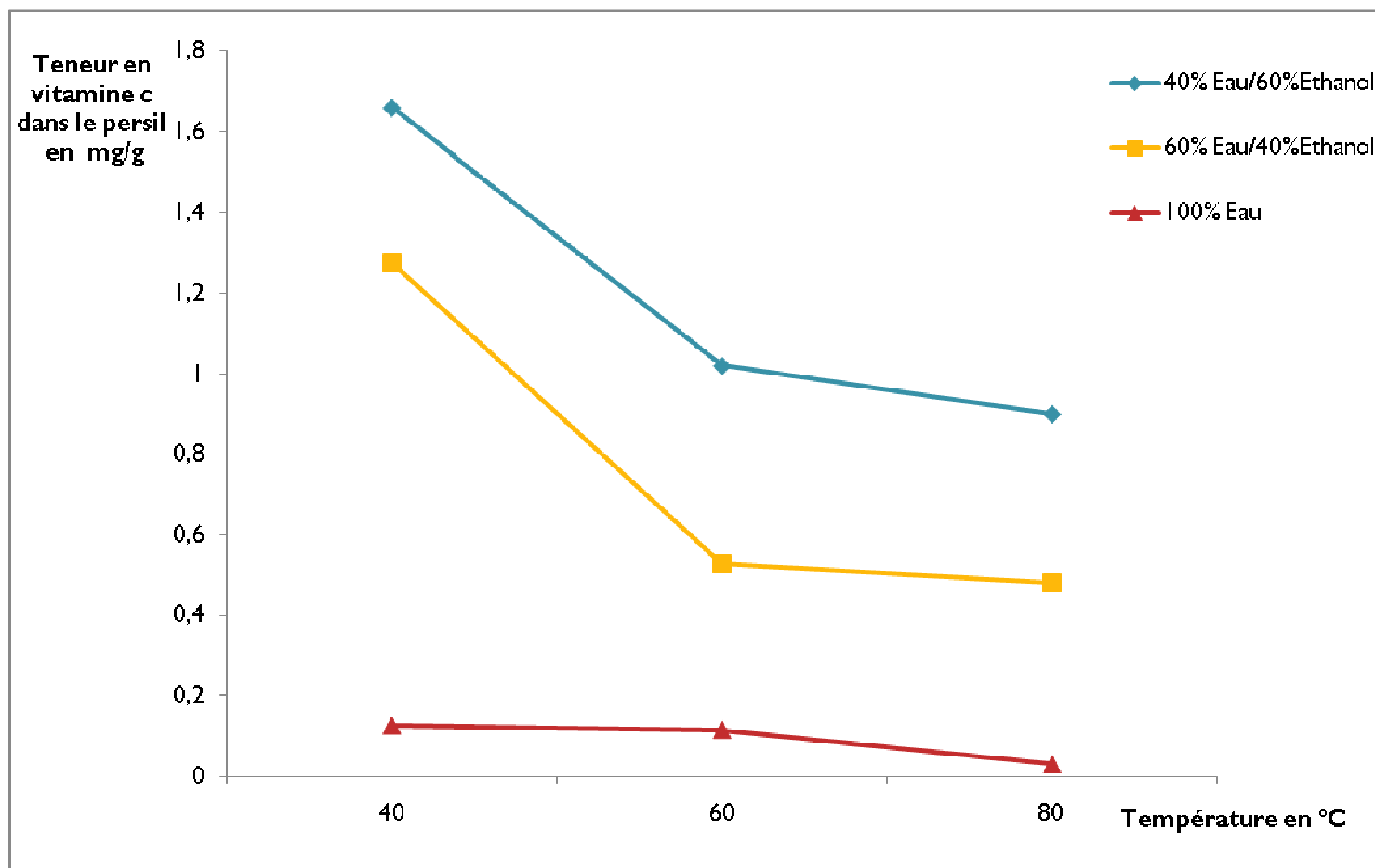


Figure3 : Influence de la température sur la teneur de l'extrait du persil en vitamine C.

D'après la figure 1 on remarque une légère diminution au niveau de la teneur en vitamine C dans le persil lorsqu'on augmente la température et aussi lorsqu'on change les pourcentages du mélange eau/éthanol en ordre croissant. La meilleure valeur notée de la teneur en vitamine C dans le persil est 1,66mg/g correspondant à celle du mélange eau/éthanol (40/60) à 40°C, suivi par celle obtenue avec le mélange eau/éthanol (60/40)(1,02mg/g) et enfin celle de l'extrait aqueux (0,9mg/g) à la même température.

I-2-2. L'extraction du poivron rouge à différentes température 40, 60, 80°C

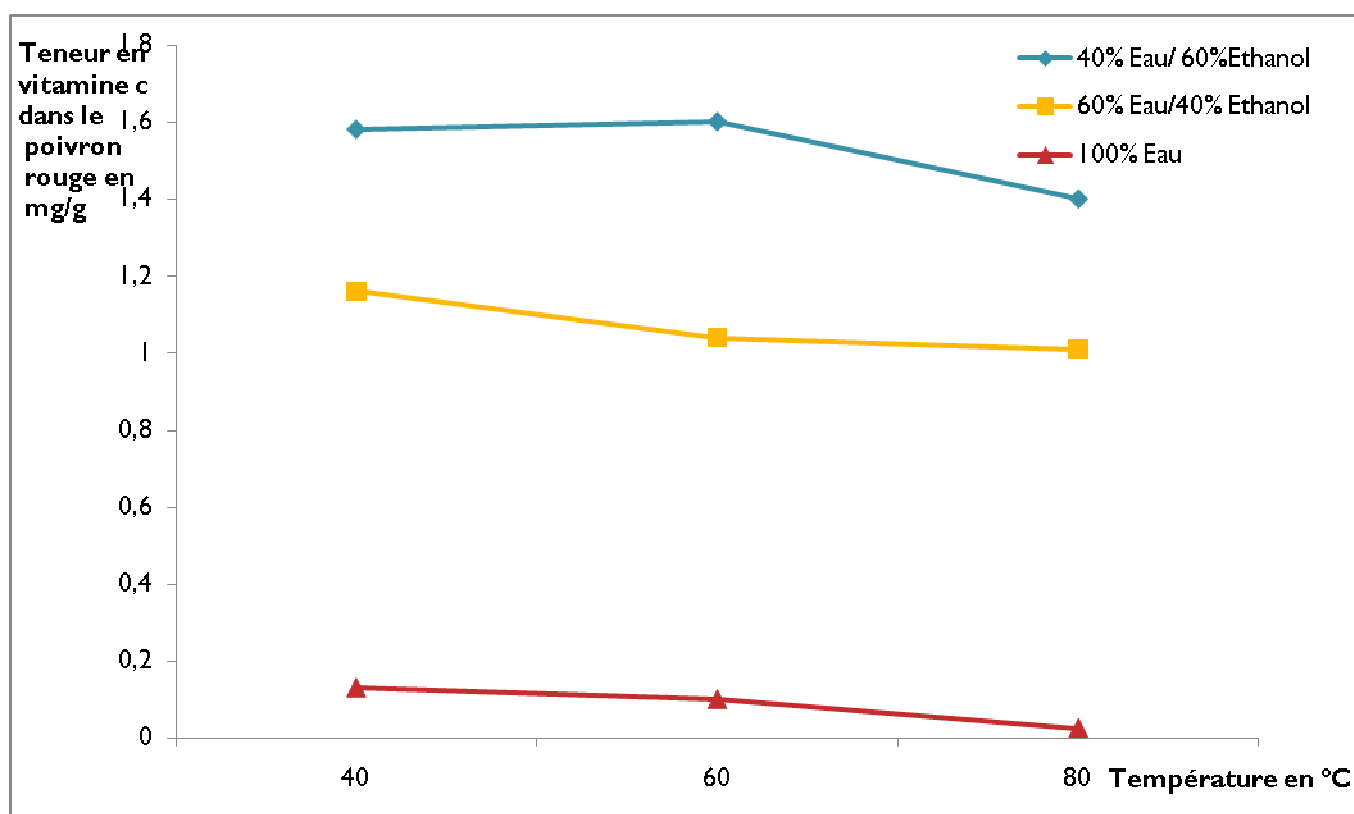


Figure 4 : Influence de la température sur la teneur en vitamine C de l'extrait de poivron rouge.

D'après la figure 2 on remarque une légère diminution au niveau de la teneur en vitamine c extrait à partir du poivron rouge lorsqu'on augmente la température. La meilleure valeur a été notée à 40°C pour les différents rapports eau/éthanol ; à savoir, 1,6mg/g, 1,58mg/g et 1,4mg/g pour les rapports 60 /40,40/60 et 100% d'eau respectivement.

D'après les résultats obtenus, la température optimale de l'extraction de la vitamine C à partir du poivron rouge et du persil et de l'ordre de 40°C. Les mêmes résultats ont été obtenus par Bdour et Frag (2000) qui ont étudié l'effet de la température sur la décomposition de la vitamine C, en suivant la vitesse de décomposition de celui-ci dans le jus de pamplemousse et dans de l'eau pure à différentes températures (15, 25 et 50°C). La vitesse de décomposition de la vitamine C a montré que cette molécule se décompose plus rapidement dans de l'eau pure que dans le jus de pamplemousse et que la vitesse de décomposition s'accroît avec l'augmentation de la température.

François Pelletier et Daphney St-Louis (1999) ont étudié l'influence de ce paramètre sur l'acide ascorbique pur et sur des jus commerciaux, en faisant varier la température de 2 à 70°C. La méthode d'analyse utilisée est celle de l'iode. Les résultats expérimentaux montrent que la concentration de l'acide ascorbique pur diminue dans le temps pour une même température et varie légèrement quand la température augmente.

Hamawe Rowaida, El-Hadj Abir et Obéigi Renée(1999) ont procédé à l'étude cinétique de l'acide ascorbique pur et à celle d'un jus de pamplemousse, à l'ombre et à la lumière, en maintenant la température constante. La méthode d'analyse utilisée est celle du 2,6 DCPI. Les résultats obtenus montrent clairement que la vitamine C se dégrade à la lumière, mais pas à l'ombre.

La baisse de la teneur en vitamine C dans le persil et le poivron rouge pourrait être due à la température : la vitamine C diminue et varie légèrement quand la température augmente. On peut conclure qu'au-delà de 70°C la température est un agent dénaturant de la vitamine C. Or, une température entre 60 et 70°C dénature l'acide ascorbique oxydase, enzyme présent au niveau des fruits et légumes. Comme cette enzyme catalyse le processus d'oxydation, cette température peut servir à protéger la vitamine C.

I-3. Optimisation du temps d'extraction

L'optimisation du temps d'extraction a pour but de chercher la meilleure teneur en vitamine C en fonction du temps.

I-2-1. L'extraction du persil avec le mélange Eau/Ethanol en fonction du temps pour la température optimale 40°C

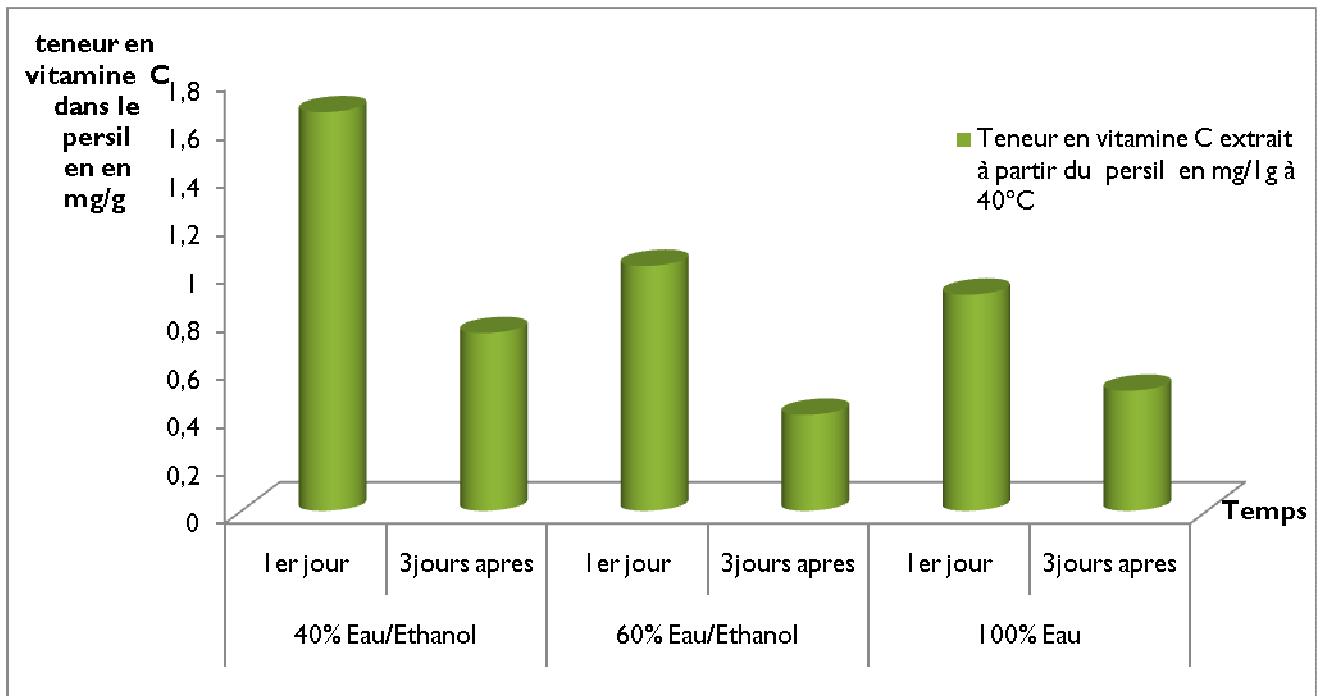


Figure 5 : Teneur en vitamine C à partir d'extrait de persil en fonction du temps.

I-2-2. L'extraction du poivron rouge avec le mélange Eau/Ethanol en fonction du temps

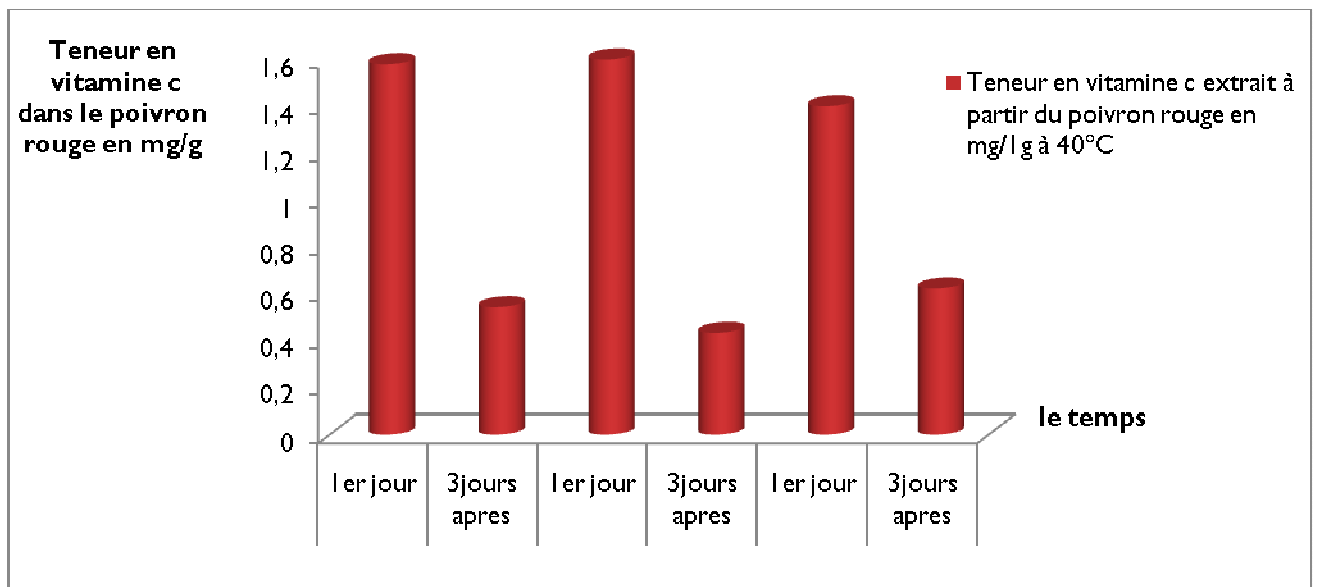


Figure 6 : Teneur en vitamine C à partir d'extrait du poivron rouge c en fonction du temps.

Les résultats schématisés sur les figures 3 et 4 montrent clairement que la teneur en vitamine C du persil et du poivron rouge diminue après trois jours d'exposition à la lumière

et à température ambiante. La diminution de la concentration de l'acide ascorbique a été remarquable chez les trois rapports eau/éthanol utilisés pour l'extraction.

Cette étude portant sur l'influence du temps d'exposition des extraits de la vitamine C, à partir du persil et du poivron rouge, à la lumière et à température ambiante, nous a permis de conclure qu'une quantité importante de ce principe actif se dégrade lors de l'extraction en absence d'un agent protecteur. D'où vient l'idée de l'utilisation de l'acide métaphosphorique pour l'extraction de l'acide ascorbique. Ce produit qui a la capacité de protéger la vitamine C contre les agents oxydants, la lumière entre autres.

I-2-3. Effet de l'exposition à la lumière et le temps sur l'extraction de la vitamine C par l'acide métaphosphorique

Tableau 1 : La teneur en vitamine C dans le persil et le poivron rouge en fonction du temps.

	Poivronrouge		Persil	
Temps	1 ^{er} jour	3 ^{eme} jours	1 ^{er} jour	3 ^{eme} jours
Teneur en de vitamine C avec l'extraction de l'acide métaphosphorique en mg/g	1,61	1,39	1,87	1,77
Teneur en vitamine C avec l'extraction en Eau/Ethanol en mg/g	1,6	0,43	1,66	0,74

Les résultats obtenus montrent clairement que la vitamine C ne se dégrade pas facilement en présence de l'acide métaphosphorique, il n'y a pas une grande différence entre la quantité trouvé en 1^{er} jour et celle trouvée en 3^{eme} jours pour le persil et le poivron rouge. Par contre en présence d'Eau /Ethanol la teneur en vitamine C se diminue facilement.

La lumière est considérée comme un facteur majeur de variation des teneurs en vitamine C au cours de l'extraction. Ainsi, l'augmentation du temps d'exposition à la lumière entraîne une diminution des teneurs en vitamine C. Inversement, le pool de vitamine C reste plus au moins stable en présence d'un agent protecteur comme l'acide métaphosphorique. La lumière peut agir de manière directe sur la teneur en vitamine C en induisant les réactions d'oxydation de celui-ci. Mais elle peut également modifier de manière indirecte la teneur de la vitamine C dans les extraits en augmentant leur température, autre agent dénaturant. De plus, la lumière pourrait contrôler la synthèse d'ascorbate via la photosynthèse et la teneur en sucre, substrat de synthèse de l'ascorbate et pourrait influencer les transports de sucres, d'autres précurseurs ou de vitamine C en provenance des feuilles (Li et al., 2008c).

Nos résultats nous renseignent sur la concentration de la vitamine C dans le persil et le poivron rouge. Pour évaluer la valeur nutritive et pouvoir se prononcer sur le mode d'alimentation pour lequel on devrait opter, il faudrait vérifier beaucoup d'autres nutriments, avec beaucoup d'autres légumes. Notre objectif a seulement conclu qu'il est plus facile de combler notre apport quotidien en vitamine C avec le persil et le poivron rouge.

Avec les incertitudes sur nos mesures, les résultats obtenus et ceux cités dans la bibliographie (valeur théorique) sont assez proches. Pour le persil, on a obtenu une incertitude d'environ 0,13 donc : $(1,87 \pm 0,13)$ mg/g. La valeur théorique étant située entre 1,6 et 2mg/g. Pour le poivron rouge, on a obtenu une incertitude d'environ 0,39, donc $(1,61 \pm 0,39)$ mg/g, la valeur théorique étant située entre 1,6 et 2mg/ g. Ce qui est relativement bien.

II- Production de la vitamine C par voie biologique

Nous avons choisi pour cette étude une souche de champignon BGF baptisée dans le laboratoire de Biotechnologie de la Faculté des Sciences DHEM-Fès. Elle est bien connue dans le laboratoire par sa performance à produire des molécules bioactives.

L'utilisation de la souche *BGF* comme biocatalyseur pour la production de la vitamine C à partir d'un substrat qui est le glucose est l'un des objectifs de cette partie. L'acide ascorbique est une molécule très proche du glucose qui ne diffère de ce dernier que par le nombre des éléments représentés en indice à côté du O du H et du C, et on sait déjà que le glucose oxydase est une enzyme naturellement produite par des souches mycéliennes telles qu'*Aspergillus niger* et *Penicillium amagasakiense* (HE Lucia de Brouckère - MEURICE - R et D asbl, 2009). La souche *BGF* possède l'arsenal enzymatique nécessaire (glucose oxydase

entre autre) pour produire la vitamine C à partir du glucose. Ce dernier est une molécule très proche à l'acide ascorbique, d'où l'idée d'utiliser ce microorganisme pour cette bioconversion.

II-1. La bioconversion :

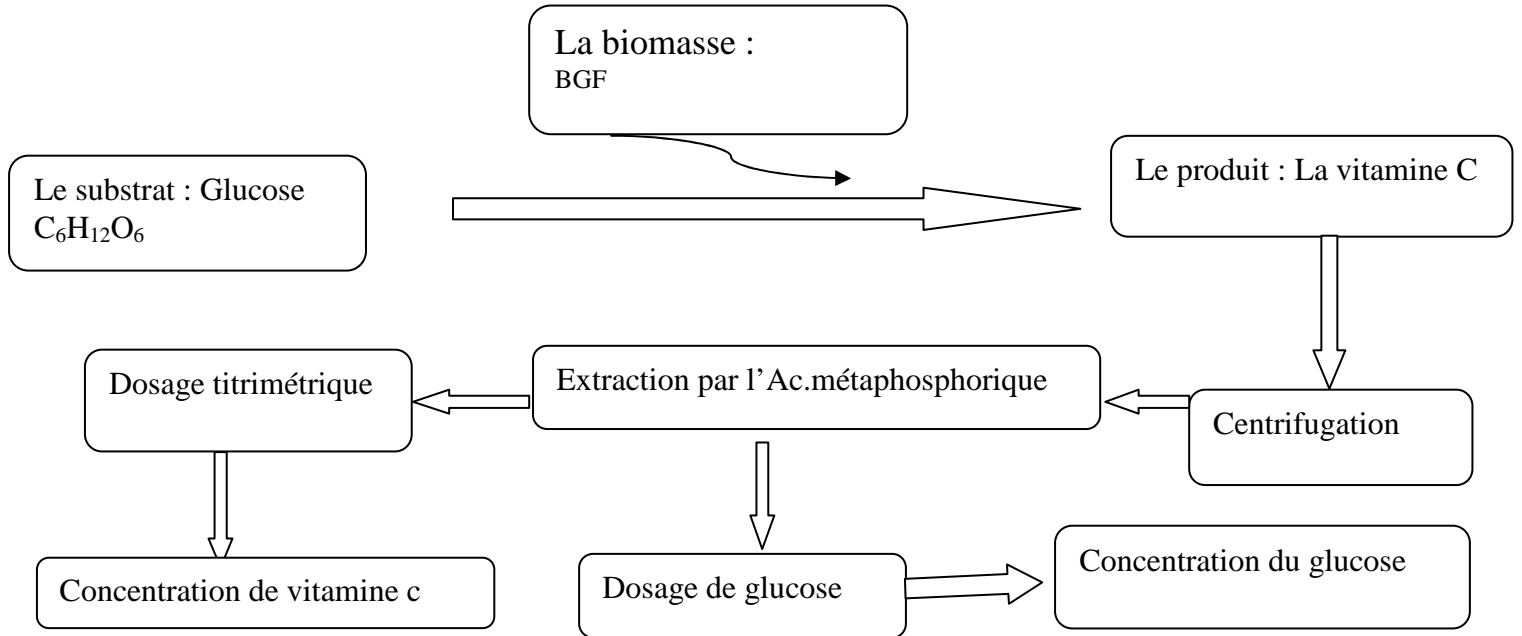


Figure 7 :Schéma de la bioconversion par la souche BGF.

II-2. Conditions de production de la vitamine C par le champignon BGF

La culture avec BGF a été réalisée dans un milieu de culture qui contient le glucose à une température de 30 ° C et avec une agitation de 200 tr / min, pendant 4 jours. La durée est justifiée par la valeur optimale de la biomasse. 24h de culture après les 4 jours avec BGF a été réalisée pour étudier la vitesse de la production de la vitamine C.

II-3. Confirmation de la méthode du dosage de glucose

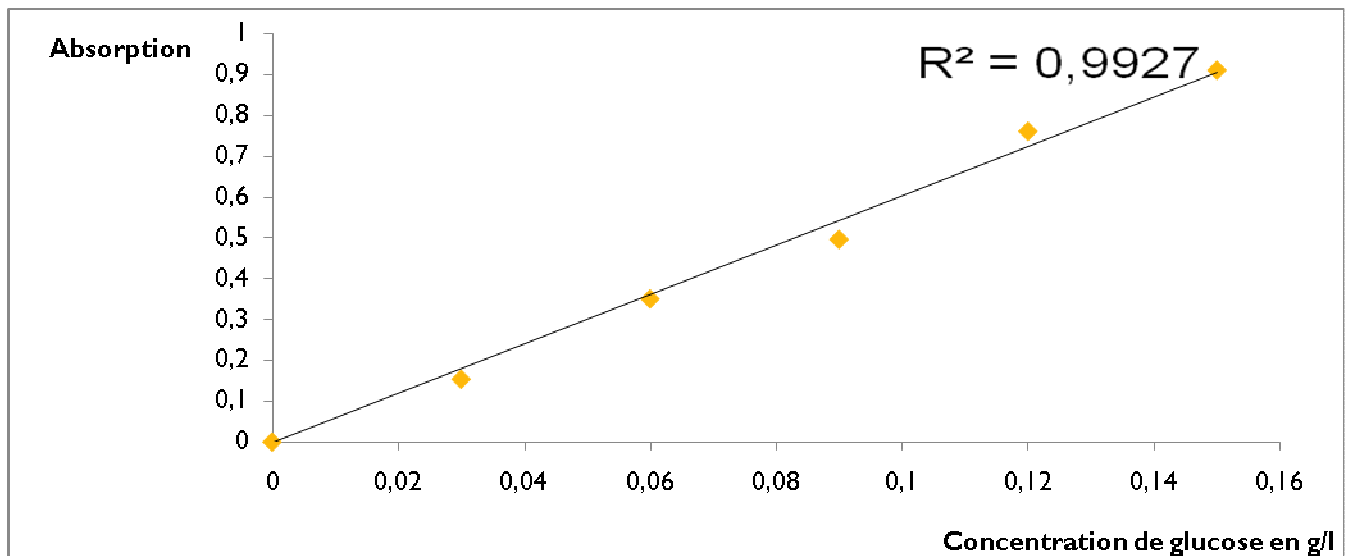


Figure 8 : La courbe d'étalonnage de la Méthode de dosage du glucose par le DNS.

D'après la courbe d'étalonnage le coefficient de corrélation ($R^2=0,9927$) entre la concentration de glucose et l'absorption est acceptable, donc on peut valider notre méthode de dosage par le DNS.

II-4. Cinétique de la consommation du glucose par la souche BGF

Le dosage du glucose par la méthode DNS a été réalisé après centrifugation du milieu de culture.

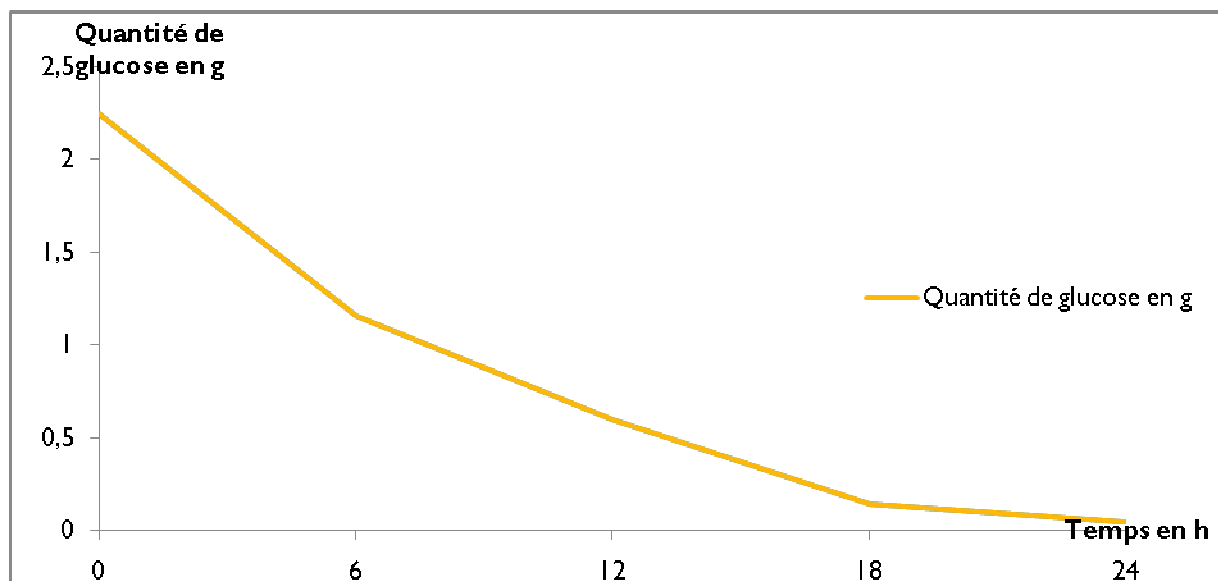


Figure 9 : Suivre de la quantité du glucose dans le milieu de culture fonction du temps.

La quantité du glucose dans le milieu de culture a passé de 2,25 g à 0,05 g au bout de 24 h, ce qui montre que ce dernier a été presque totalement métabolisé par la souche *BGF*.

II-5. Dosage de la vitamine C dans le milieu qui contient la souche *BGF*

Le dosage de la vitamine C a été réalisé par titration, après extraction à partir du milieu de culture centrifugé.

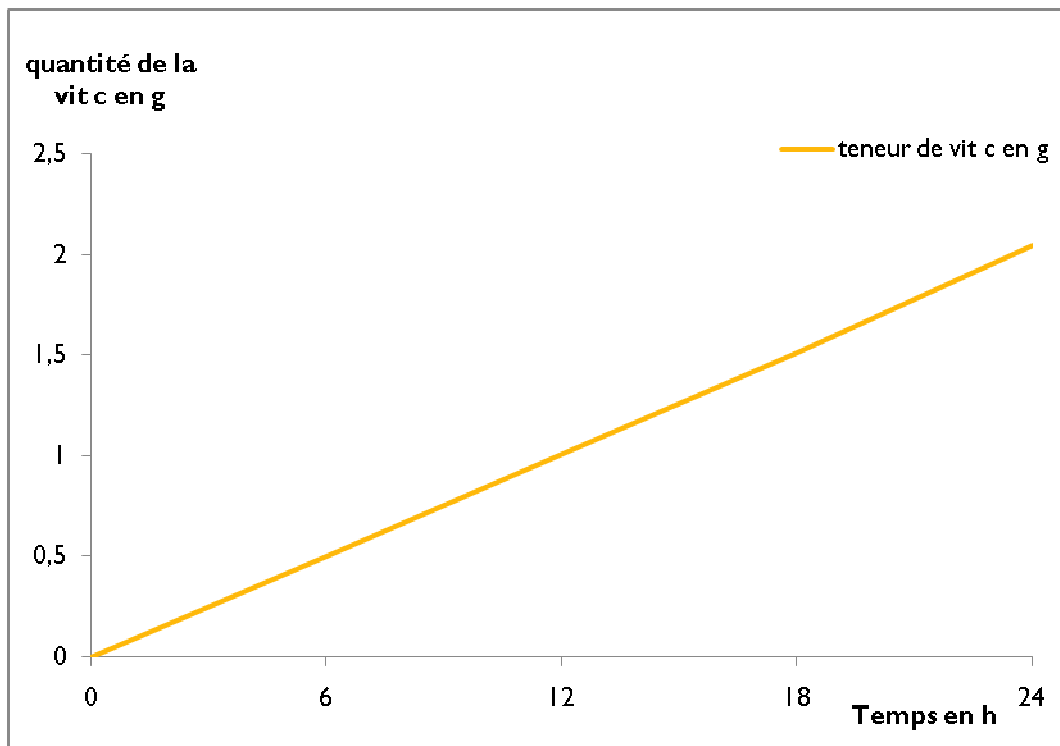


Figure 10 : Évolution quantité de la vitamine c dans le milieu culture en fonction du temps.

D'après la figure 10, on remarque que la quantité de la vitamine C dans le milieu de culture contenant la souche *BGF* a passé de 2,05 g au bout de 24h. Les résultats obtenus montrent clairement que la concentration de la vitamine C augmente en fonction du temps.

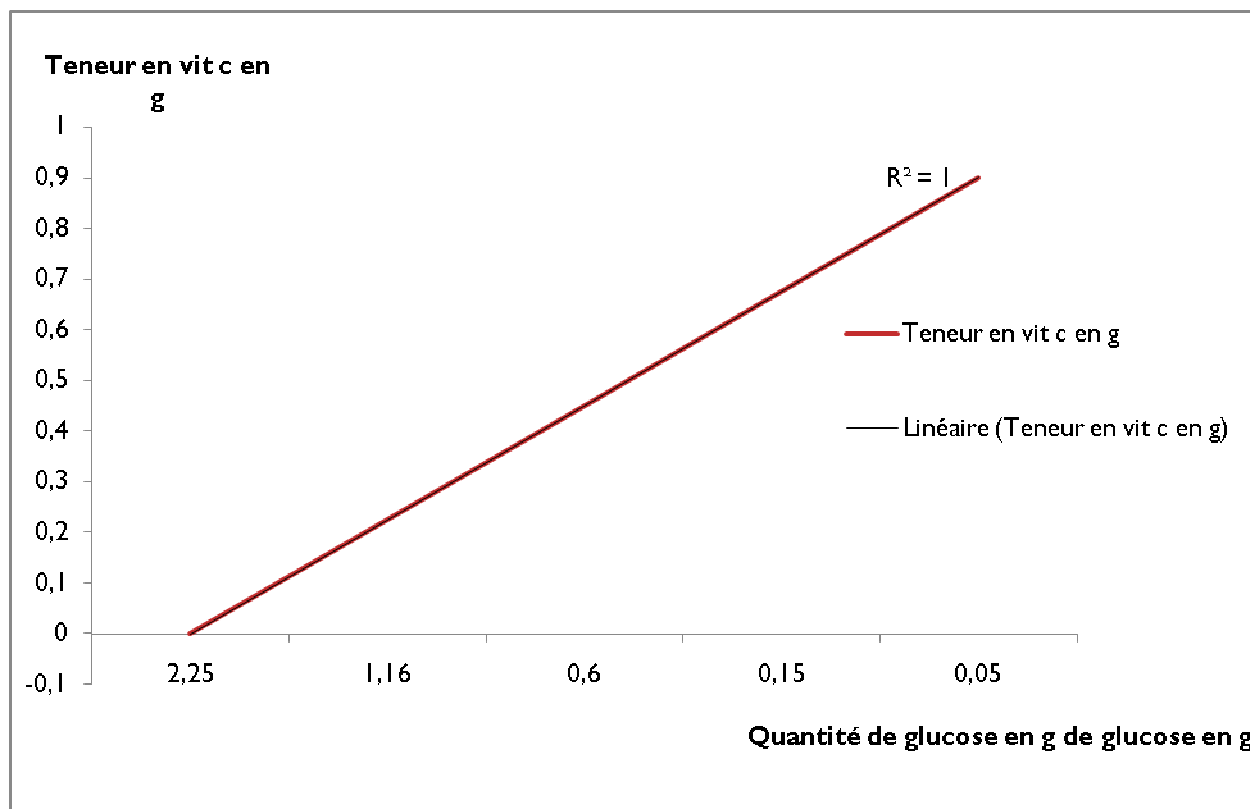


Figure 11 : *Variation de la concentration de vitamine c dans le milieu de culture en fonction de la concentration du glucose.*

La figure 11 montre une forte corrélation entre la quantité de la vitamine C produite dans le milieu et celle du glucose consommée par la souche *BGF*. Les résultats obtenus montrent que cette souche transforme le glucose en vitamine C.

Le coefficient de corrélation reliant la quantité du glucose consommée à celle de la vitamine C produite par la souche *BGF* dans le milieu de culture est fortement significatif ($R^2 = 1$), ce qui indique que presque la totalité du glucose est converti en acide L-ascorbique.

$$Y_{VitC} = \frac{[Glu]_{int}}{[VitC]_{prd}} \times 100$$

La bioconversion du glucose en acide L-ascorbique par la souche *BGF* a donné un rendement important qui a pu atteindre les 90% avec une vitesse de bioconversion de 0,1 g de vitamine C produit/h. Ce rendement qui dépasse largement celui obtenu par Hsin-Ju et al.(2007). Ils ont obtenu un rendement de 67% en étudiant la bioconversion du sucre en

vitamine C par *Aspergillus niger*. Rao et Sureshkumar (2000) ont obtenu un rendement moyen avec *Xanthomonas campestris*.

III- Activité antioxydant des extraits du persil et du poivron rouge

Il est bien connu que la vitamine C est un puissant antioxydant. Pour compléter notre étude nous avons songé à comparer le pouvoir antioxydant des légumes que nous avons choisis pour extraire la vitamine C et celui de la vitamine C industrielle (comprimé).

L'activité antioxydante a été déterminée par la méthode β -Carotène-linoléate bleaching essay. Dans cette expérience, nous avons utilisé le BHT (butyle hydroxytoluène) comme standard. Pour la mesure du pouvoir antioxydant, nous avons préparé la même concentration en vitamine C (0.018mg/ml) pour le persil et le poivron rouge. Par contre Pour la vitamine C Industrielle (comprimé) la concentration est de 0.18 mg/ml soit 10 fois plus élevée en vit C que celle du persil et du poivron. Chaque expérience a été répétée 3 fois. La valeur moyenne des 3 expériences est celle qui a été prise en compte.

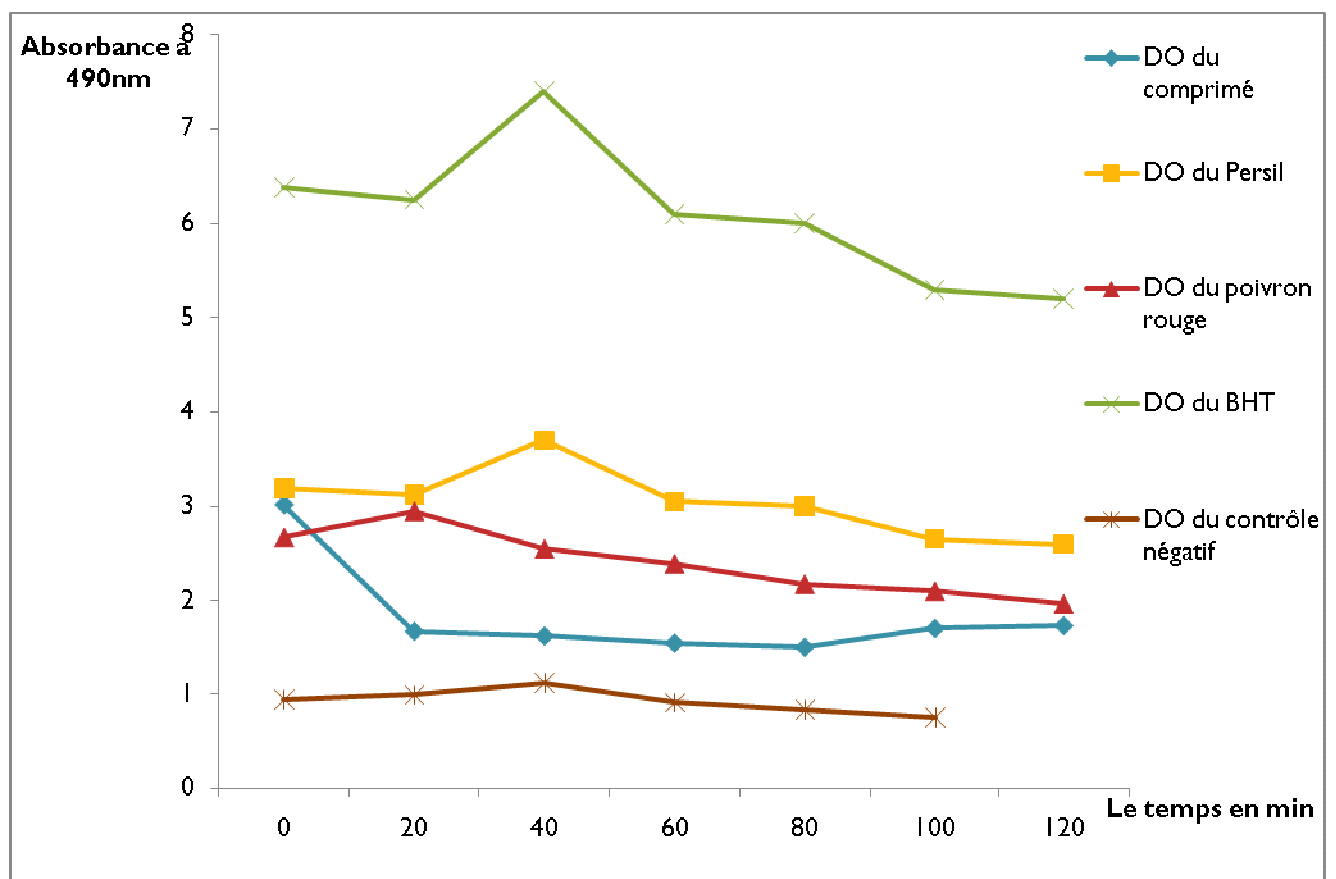


Figure 12 : Variation de l'absorbance à 490 nm de différents extraits des produits en fonction du temps.

D'après la figure 12 en remarque que l'absorbance du BHT est bien élevé ce qui confirme l'activitéantioxydante. On note aussi que les absorbances des deux extraits et de la vitamine C industrielle étudiés sont proches avec des différences bien marquées pour chacun.

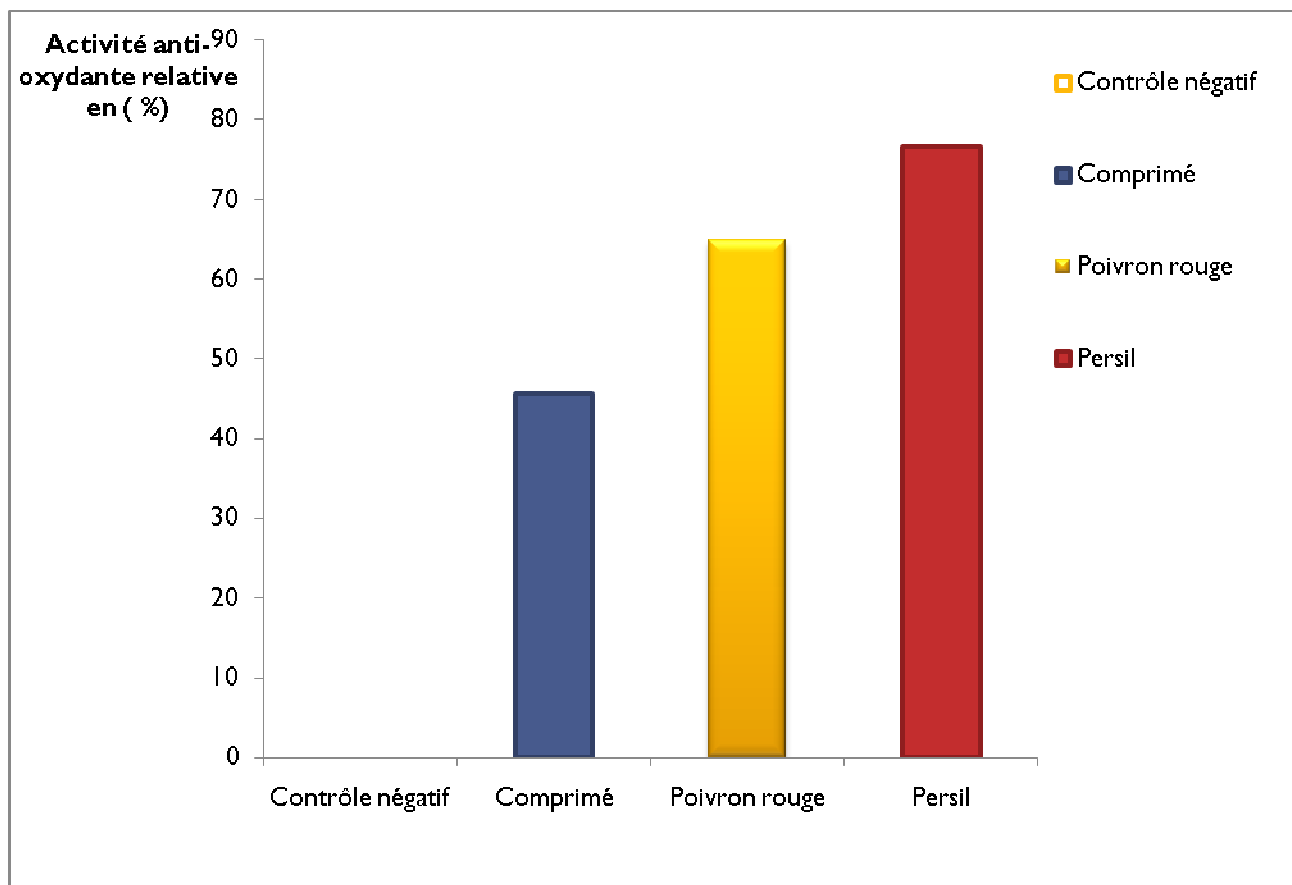


Figure 13 : *Comparaison de l'activité anti-oxydante relative des extraits de persil, poivron rouge et la vitamine C industrielle (comprimé).*

Cette figure illustre la comparaison de l'activité antioxydant relative entre les extraitsdu persil,du poivron rouge et la vitamine C industrielle (Comprimé). D'après cette figure en remarque que l'activité antioxydante du persil (76,67%)dépasse celle du poivron rouge (64,92%) et celle du vit C industrielle (45,64%)

Pour la même concentration en vitamine C,on peut conclure que l'activité antioxydante de l'extrait du persil est 12% plus élevée que celle du poivron rouge et encore plus élevée (300%)que celle du comprimé. Ainsi l'activité antioxydante de l'extrait du poivron rouge est de 200 % plus élevée que celle du comprimé

L'acide métaphosphorique est présent dans les extraits des plantes et non pas dans la solution du comprimé, nous pouvons émettre les hypothèses suivantes :

- 1- L'acide métaphosphorique pourrait jouer un rôle de conservation de l'activité antioxydante de la vitamine C.
- 2- Le pouvoir antioxydant élevé des extraits des légumes est dû à la présence, dans l'extrait, d'autres molécules antioxydantes.
- 3- Le pouvoir antioxydant de la vitamine C industrielle synthétique est faible

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Une demande croissante et un nombre croissant de concurrents mondiaux sont la force motrice pour le développement de méthodes alternatives de production et d'extraction de la vitamine C.

Cette étude révèle l'influence de la température, du temps d'exposition à la lumière et le choix des solvants d'extraction sur la stabilité de la vitamine C extraite à partir du persil et du poivron rouge. D'une manière générale, nous avons constaté que les bons rendements d'extraction ont été obtenus à 40°C en utilisant l'acide métaphosphorique comme solvant. Cependant l'extraction à l'eau et à l'éthanol (40/60) à 40°C pourrait être la méthode de substitution bien que la vitamine C extraite sans l'acide métaphosphorique se dégrade plus facilement. Cette méthode présente l'avantage d'avoir comme solvant l'éthanol. Celui-ci pourrait être naturel et en plus il est toléré dans les produits Bio. Dans les prochaines études nous devons nous concentrer sur ce problème et essayer de trouver un substituant naturel qui pourrait remplacer l'effet de l'acide métaphosphorique et éviter la dégradation de la vitamine C.

L'acide ascorbique (vitamine C) a été produit industriellement à partir de D-glucose par la méthode bien connue Reichstein, cette méthode de production chimique a certaines caractéristiques indésirables tels que la consommation élevée d'énergie et l'utilisation de grandes quantités de solvants organiques et inorganiques. Par conséquent, au cours des dernières décennies, d'autres méthodes pour la fabrication de l'acide L-ascorbique en utilisant la bioconversion microbienne. Cette dernière méthode est naturelle, plus économique et plus écologique.

Le présent travail a étudié la bioconversion du glucose en vitamine C, par le biais de la souche BGF fournie par le Laboratoire de Biotechnologie. La culture de la souche BGF a été réalisée dans un milieu de culture qui contient le glucose comme source de carbone à la température de 30°C avec une agitation de 200 tr / min. La bioconversion du glucose en acide L-ascorbique par la souche BGF a donné un rendement important qui a pu atteindre les 90%. Dans les citations bibliographiques (Hsin-Ju et al. (2007)), la même méthode de bioconversion avec des souches différentes le rendement n'a jamais dépassé 67%.

La souche du champignon BGF du laboratoire de Biotechnologie est beaucoup plus performante dans la production de la vitamine C à partir du glucose. Dans les prochaines études nous précéderons à encore optimiser cette technique dans un pilote semi industriel.

Pour la même concentration en vitamine C, l'activité antioxydante de l'extrait du persil est 12% plus élevée que celle du poivron rouge et encore plus élevée (300%) que celle du comprimé. Ainsi l'activité antioxydante de l'extrait du poivron rouge est de 200 % plus élevée que celle du comprimé

L'acide méthaphosphorique est présent dans les extraits des plantes et non pas dans la solution du comprimé, nous pouvons émettre les hypothèses suivantes :

- 4- L'acide méthaphosphorique pourrait jouer un rôle de conservation de l'activité antioxydante de la vitamine C.
- 5- Le pouvoir antioxydant élevé des extraits des légumes est du à la présence, dans l'extrait, d'autres molécules antioxydantes.
- 6- Le pouvoir antioxydant de la vitamine C industrielle synthétique est faible

Dans les prochaines études nous procéderons à vérifier chacun de ces hypothèses mais d'après la bibliographie La 2^{ème} hypothèse est la plus plausible. La vitamine C garde son activité antioxydante maximale dans son milieu biologique (fruits et légumes). Il est préférable de consommer la vitamine C dans les aliments frais Ceci permet d'un côté d'avoir le maximum d'activité et de l'autre côté de consommer d'autres molécules antioxydants.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(AFSSA). Agence française de sécurité sanitaire des aliments Apports nutritionnels conseillés en vitamine C pour la population française [Consulté le 16 avril 2009] www.afssa.fr.

Abbasi Souraki, B., D. Mowla, 2008. Experimental and theoretical investigation of drying behavior of garlic in an inert medium fluidized bed assisted by microwave. *Journal of Food Engineering*, 88, 438–449.

Abushita April, A. A., Hebshi, A. E., Daood, G. H., & Biacs, A. P. (1997). Determination of an antioxidant vitamin in tomatoes. *Food Chemistry*, 60(2), 207–212.

Ana-Maria Hossu, Cristiana Radulescu, Ionica Ionita, Elena Irina Moater, 2006. Methodes spectrophotometriques et chromatographiques pour la determination de la vitamine c. 225-232

Anderson, S., Marks, C.B., Lazarus, R., Miller, J., Stafford, K., Seymour, J., Light, D., Rastetter, W., Estell, D., 1985. Production of 2-keto-l-gulonate, an intermediate in l-ascorbate synthesis, by a genetically modified *Erwinia herbicola*. *Science* 230, 144– 149.

Arakawa, N., Otsuka, M., Kurata, T., Inagaki C., 1981 a. Separative determination of ascorbic acid and erythorbic acid by high performance liquid chromatography. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 27, 1-8.

Arakawa, N., Tsutsumi, K., Sanceda N., Kurata T., Inagaki C., 1981 b. A rapid and sensitive method for the determination of ascorbic acid using-4,7-diphenyl-1,10 phenanthroline. *Agric. Biol. Chem.*, 45, 1289-1290.

Archer, A.W., Higgins, V.R., Perryman, D.L., 1980. Determination of ascorbic and erythorbic acids by high-performance liquid chromatography. *J. Assoc. Public. Anal.*, 18, 99-103.

Arctander, S., Ed.Montclair, N.J., 1969. *Perfume and Flavor Chemicals*, Vols. I and II. Huelin, F.E., Coggiola, I.M., Sidhu, G.S., Kennett, B.H, 1971. The anaerobic decomposition of ascorbic acid in the pH range of foods and in more acid solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 22 (10), 540-542.

Ashoor, S.H., Woodrow, C.M., Seperich, J., Welty, J., 1984. Liquid chromatographic determination of ascorbic acid in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 67, 78-80.

Augustin, J., BECK, C., Marousek, G., 1981. Quantitative determination of ascorbic acid in potatoes and potato products by high performance liquid chromatography. *J. Food Sci.*, 46, 312-316.

Bajaj, K.L., Khaur G., 1981. Spectrophotometric determination of L-ascorbic acid in vegetables and fruits. *Analyst*, 106, 117-120.

Bdour AlChekfeh et Nadia Farag, Hiver 2000. Sciences de la nature, effet de la temperature sur la décomposition de la vitamine C

Berry, A., Running, J.A., Severson, D.K., Burlingame, R.P., 1999. Vitamin C production in microorganisms and plants. World Intellectual Property Organisation Patent WO 99/64618.

Beutler, H.O., Beinstingl, G., 1980. Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Lebensmitteln. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, 76, 69-75.



Bianchi, J., Rose, R.C., 1985. The chromatographic separation and radiochemical quantification of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and diketogulonic acid. *J. Micronutr. AnaL*, 1,3-11.

Boehringer-Manhein, 1980. Acide L-ascorbique. Méthode colorimétrique pour la détermination de l'acide L-ascorbique dans les aliments. Boehringer-Manhein France, Réf. 409677.

Bourgeois, C.F., Maingy, P.R., 1975. Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in foods. *Intern. J. Vitamine Nutr. Res.*, 45, 70-84.

British Pharmacopoeia, 5th ed., HM Stationery Office, London, 1988.U

Bul-Nguyen ,M.H., 1980. Application of high performance liquid chromatography to the separation of ascorbic acid from isoascorbic acid. *J. Chromatogr.*, 196, 163-165.

Carnevale, J., 1980. Determination of ascorbic, sorbic and benzoic acid in citrus juices by high performance liquid chromatography. *Food Technol.*, 32, 303-305.

Carr, A., Frei, B., 1999 Jun. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions. *The FASEB Journal.*; 13 : 1007-24.

Carr, R.S., Neff, J.M., 1980. Determination of ascorbic acid in tissues of marine animals by liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal. Chem.*, 52, 2428-2430.

CEE, 1981. Dosage de l'acide ascorbique et de l'acide déhydroascorbique (vitamine C). Directive n° 73-46 du 5/12/72 (JOCE du 30/03/73) modifiée par directive n° 81-680 du 30/07/81 (JOCE du 29/08/81).

Chemat, F., M. Vian, F. Visionsi, 2008. Microwave hydrodiffusion for isolation of natural products. Brevet Européen, EP 1 955 749 A1.

Chiavaro, E., M.T. Rodriguez-Estrada, E. Vittadini, N. Pellegrini, 2010. Microwave heating of different vegetable oils: Relation between chemical and thermal parameters. *LWT – FoodScience and Technology*, 43, 1104-1112.

Coustard, J.M., Sudraud, G., 1981. Sépçration des acides ascorbique et isoascorbique par chromatographie de paires d'ions sur phase inverse. *J. Chromatogr.*, 219, 338-342.

Delic, V., Sunic, D., Vlastic, D., 1989. Microbial reactions for the synthesis of vitamin C (l-ascorbic acid). In: Vandamme, E.J. (Ed.), *Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors*. Elsevier, London, pp. 229–334.

Deneke, U., Michal, G., Beutler H., 1978. Neue Methode zur Bestimmung von Vitamin C in Lebensmitteln. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, 74, 400-403.

Dennison, D.B., Brawley, T.G., Hunter, G.L.K., 1981. Rapid high performance liquid chromatographic determination of ascorbic and combined ascorbic acid-dehydroascorbic acid in beverages. *J. Agric. Food Chem.*, 29, 925-927.

Deutsch, M.J., Weeks, C.E., 1965. Microfluorometric assay for vitamin C. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 48, 1248-1256.

Devries, J.W., 1983. Semi-automated fluorometric method for determination of vitamin C in foods : a collaborative Study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 66, 1371-1376.

Doncheck, J.A., Huss, R.J., Running, J.A., Skatrud, T.J., 1996. L- Ascorbic acid containing biomass of *Chlorella pyrenoidosa*. US Patent 5,521,090.



Doner, L.W., Hicks, K.B., 1981. High performance liquid chromatographic separation of ascorbic acid, erythorbic acid, dehydroascorbic acid, dehydroerythorbic acid and diketogulonic acid. *Anal. Biochem.*, 115, 225-230.

Dr. Priska Binz Nocco, 2009. La vitamine C remplit de nombreuses fonctions importantes dans l'organisme, Article n° 2730 | Edition n° 69 |

Dumnire, D.L., Reese, J.O., Brya, R., Seegers, M., 1979. Automated fluorometric determination of vitamin C in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 62, 648-652.

Egberg, D.C., Potter, R.H., Heroff, J.C., 1977. Semi-automated method for the fluorometric determination of total vitamin C in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 60, 126-131.

Englard, S., et S. Seifter, 1986. Les fonctions biochimiques de l'acide ascorbique. *Annual Review of Nutrition* 6: 365-406.

Farmacopeea Româna, ed X, Editura Medicala, Bucarest, 1993.

Fatibello-filho, O., Vieira, I., 2000. L-ascorbic acid determination in pharmaceutical formulations using a biosensor based on carbon paste modified with crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*). *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 11, No. 4, pp. 412 - 418.

Finley, J.W., Duang, E., 1981. Resolution of ascorbic, dehydroascorbic and diketogulonic acids by paired-ion reverse phase chromatography. *J. Chromatogr.*, 207, 449-453.

Floridi, A., Coli, R., Fidanza A.A., Bourgeois F., Wiggins R.A., 1982. High performance liquid chromatographic determination of ascorbic acid in food. Comparison with other methods. *Intern. J. Vitamine Nutr. Res.*, 52, 194-197.

Fortherby, Martin, Williams, Julie, Forster, Louise, Craner, Paul, Ferns, GOrden, 2000. "Effet de la vitamine C sur la pression artérielle ambulatoire et les lipides plasmatiques chez les personnes âgées". *Journal of Hypertension* 18(4) :541-4 doi : 10.1097/00004872-200018040-00009. PMID 10779091.

François Pelletier et Daphney St-Louis, Automne 1999. Sciences de la nature, étude cinétique à l'ombre et à la lumière de la vitamine C

Franke, M., C.L. Winek, H.M. Kingston, 1996. Extraction of selected drugs from serum using microwave irradiation. *Forensic Science International*, 81, 51-59.

Ganzler, K., A. Salgo, K.J. Valko, 1986. Microwave extraction: a novel sample preparation method for chromatography. *Journal of Chromatography*, 371, 229-306.

Geigert J., Hirano, D.S., Neidleman, C.S.L., 1981. High performance liquid chromatographic method for the determination of L-ascorbic acid and D-isoascorbic acid. *J. Chromatogr.*, 206, 396-399.

Gil-Izquierdo, A., Gil, M.I., Ferreres, F., 2002. Effect of processing techniques at industrial scale on orange juice antioxidant and beneficial health compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (18), 5107-5114.

Gillaji W.S., 1945. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 17, 217.

Goodyear-Bruch, C, Pierce, JD., 2002. « Le stress oxydatif dans les malades en phase critique ». *Annales de soins intensifs : une publication officielle de l'Association américaine des infirmières et infirmiers en soins critiques* 11 (6) : quiz 552-3. 543-51 PMID 12425405.



- Grandazzi, C., 2002.** Synthèse bibliographique sur le jus d'orange Montrouge, p19.
- Gray, B.E., 1945a.** Preparation of 2-keto gulonic acid and its salts. US Patent 2,421,611.
- Gray, B.E., 1945b.** Preparation of 2-keto gulonic acid and its salts. US Patent 2,421,612.
- Grun, M., Loewus, F.A., 1983.** Determination of ascorbic acid in algae by HPLC on strong cation exchange resin with electrochemical detection. *Anal. Biochem.*, 130, 188-191.
- Grun, M., Loewus, F.A., 1984.** l-Ascorbic acid biosynthesis in the euryhaline diatom *Cyclotella cryptica*. *Planta* 160, 6-11.
- Guilland, J.G., Lequeu, B., Birlouez, I., Bourgeois, G., 1998.** Vitamine C dans le statut vitaminique : Physiopathologie, exploration biologique et intérêt clinique. Paris : Technique et Documentation. pp.317 - 340.
- Guy Roulier, janvier 2005.** Extrait du livre de Guy Roulier à paraître Aux Editions Dangles "Fabuleuses plantes d'Amazonie".
- Haddad, P.R., Lau, J., 1984.** The use of high performance liquid chromatography for the analysis of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in orange juice and powdered orange drink. *Food Technol. Aus.*, 36, 46-48.
- Hamawe Rowaida, El-Hadjj Abir et Obéigi Renée, Automne 1999.** Sciences de la nature, Étude cinétique à l'ombre et à la lumière de la vitamine C.
- Hamman, A.S., 1976.** A rapid sensitive colorimetric method for the determination of L-ascorbic acid. *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, 26, 611-617.
- Hancock, R.D., Viola, R., 2002.** Biotechnological approaches for l-ascorbic acid production. *Trends Biotechnol.* 20, 299-305.
- Hardem, A., Zilva S.S., 1918.** Citée dans Handbook of vitamins (Machlin L.J., Ed. 1984). *Biochem.J.* 12, 259.
- Harris M Apson, Wang, 1942.** *Biochem. J.* 36, 183.
- Heick, H.M., Stewart, H.B., Graff, G.L., Humpers, J.E., 1969.** The occurrence of ascorbic acid in the yeast *Lipomyces starkeyi*. *Can. J. Biochem.* 47, 751-752.
- Helsper, J.P., Kagan, L., Hilby, C.L., Maynard, T.M., Loewus, F.A., 1982.** l-Ascorbic acid biosynthesis in *Ochromonas danica*. *Plant Physiol.* 69, 465-468.
- Henniger, G., 1981.** Enzymatische Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Lebensmitteln, pharmazeutische und biologischen Flüssigkeiten. *Alimenta*, 20, 12-14.
- Hiromi, K., Fujimori, H., Yamaguchi-ITO, J., Nakani, H., Ohnishi, M., Tonomura, B., 1977.** A kinetic method for the determination of ascorbic acid with 2,6-dichlorophenolindophenol. *Chem. Lett.*, (11), 1333-1336.
- Hoppe, A., Reimerdes E.H., Reuter, H., 1979.** Densitometrische Vitamin C Bestimmung in Vollmilch. *Milchwissenschaft*, 34, 263-266.
- Hsin-Ju Hsieh, Kai-Yu Tung, Giridhar R. Nair, I-Ming Chu, Wen-Teng Wu, 2007.** Production of ascorbic acid glucoside by alginate-entrapped mycelia of *Aspergillus niger*. 77:53-60



Huh, W.K., Lee, B.H., Kim, S.T., Kim, Y.R., Rhie, G.-E., Baek, Y.W., Hwang, C.S., Lee, J.S., Kang, S.O., 1998. d- Erythroascorbic acid is an important antioxidant molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Microbiol. 30, 895–903.

Isabelle Derambure, 22 septembre 2009. Académie d'Aix-Marseille 2008-2011.

Isherwood, F.A., Chen, Y.T., Mapson, L.W., 1954. Synthesis of l-ascorbic acid in plants and animals. Biochem. J. 56, 1–15.

Isono, M., Nakanishi, I., Sasajima, K.-I., Motizuki, K., Kanzaki, I., Okazaki, H., Yoshino, H., 1968. 2-keto-l-gulononic acid fermentation. Part I. Paper chromatography characterization of metabolic products from sorbitol and sorbose by various bacteria. Agric. Biol. Chem. 32, 424–431.

Jacques, F. Paul, Sulsky, Sandra, I., Perrone, Gayle, E., Jenner, Jennifer, Schaefer, Ernst, J., 1995. "Effet de la supplémentation en vitamine C sur le cholestérol de lipoprotéines, apolipoprotéines, et de triglycérides concentrations". Annals of Epidemiology 5 (1): 52-9. doi: 10.1016/1047-2797 (94) 00041-Q . PMID 7728285.

Jean-Paul Collaert, 2002. Plantes aromatiques au jardin à la cuisine.

Jehl Bruno et Madet Nicolas, 2004. l'acide ascorbique et son utilisation en tant qu'additif dans les industries alimentaires Biotechnologies (RD Hancock et al.; Trends in Biotechnology 20(JUL02) 299-305) , 6-7-8.

Jerumanis, J., DE Clerk, J., 1977. Determination of ascorbic acid in beer. Cerevisia, 2, 64-68.

Kacem, B., Marshall, M.R., Matthews, R.F., Gregory, J.F., 1986. Simultaneous analysis of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by high performance liquid chromatography with postcolumn derivatization and UV absorbance. J. Agric. Food Chem., 34, 271-274.

Kamangar, T., Fawzi, A.B., Maghsoudi, R.H., 1977. Rapid spectrophotometric determination of ascorbic acid in citrus fruits. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 60, 528-530.

Keating, R.W., Haddad, P.R., 1982. Simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid by reversed phase ion - pair high performance liquid chromatography with precolumn derivates. J. chromatogr., 245, 249-255.

Kelly, FJ, 1998. « L'utilisation des antioxydants dans la prévention et le traitement de la maladie ». Journal de la Fédération internationale de chimie clinique/ IFCC 10 (1) : 21-3 PMID 10181011.

Kelly, G.S., Latzko, E., 1980. Prospect of a specific enzyme assay for ascorbic acid (vitamin C). J. Agric. Food chem., 28, 1320-1321.

Kennedy, J.F., Rivera, Z.S., Lloy, L.L., Warner, F.P., Jumel, K.L., 1992. Ascorbic acid stability in aseptically processed orange juice in TetraBrik cartons and the effect of oxygen. Food Chemistry, 45 (5), 327-331.

Khan, M.M., Martell, A.E., 1967. Metal ion and metal chelate catalyzed oxidation of ascorbic acid by molecular oxygen. Journal of the American Chemical Society, 89, 4176-4185.

Kim, Y., Yu, S., Lee, S., Hwang, Y., Kang, S., 1996. A heme-containing ascorbate oxidase from *Pleurotus ostreatus*. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 271, No. 6, pp. 3105 - 3111.

Kneifel, W., Sommer, R., 1985. HPLC-Method zur Bestimmung von Vitamin C in Milch und Molk getranken. Z. Lebensm. Unters. Forsh., 181, 107-110.

Kolthoff et Sandell, 1936. Textbook of quantitative inorganic analysis. The Mac Millan Co N.Y., p. 584-596.



Lam, F.L., Holcomb, J.S., Fusari, S.A., 1984. Liquid chromatographie assay of ascorbic acid, nicotinamide, pyridoxine, thiamine and riboflavin in multivitamin-mineral preparations. *J. Assac. Off. Anal. Chem.*, 67, 1007-1011.

Lantis, J. C., K. L. Carr, R. Grabowy, R. J. Connolly, S. D. Schwaitzberg, 1998. Microwave applications in clinical medicine. *Surgical Endoscopy*, 12, 170-176.

Lau, M.H., J. Tang, 2002. Pasteurization of pickled asparagus using 915 MHz microwaves. *Journal of Food Engineering*, 51, 283-290.

Lehnhard, A., 1978. Spektral photometrische Bestimmung von L-Ascorbinsäure mit N-Bromosuccinimid und Jodstark. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 166, 15-18.

Leyla Yıldız, Kevser Sozgen Baskan, Esma Tutem, Resat Apak, 2008. Combined HPLC-CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay of parsley, celery leaves, and nettle. 304-313.

Li Y, Ren X, Song Y, Hou X. 2008c. Enhancement of GLDHase activity by light in maintaining AsA content in leaves of *Brassica campestris* ssp. *chinensis*. *Proceedings of the International Symposium on Endogenous and Exogenous Plant Bioregulators, IHC 2006, Seoul, Korea, 13-19 August 2006.*, International Society for Horticultural Science (ISHS).

List, D., Kneifel, W., 1980. Ascorbinsäure Bestimmung mit immobilisierter Ascorbat oxidase. *Fluess Obst.*, 47, 57-61.

Loupy, A., 2006. *Microwaves in Organic Synthesis*, 2ieme édition, Tome I et II. Wiley-VCH, Weinheim. Loones, K.T. J., Maes, B.U. W. G., Rombouts, S. Hostyn, G. Diels, , 2005. Microwave-assisted organic synthesis: scale-up of palladium-catalyzed aminations using single-mode and multimode microwave equipment. *Tetrahedron*, 61, 10338-10348.

Luthria, D.L., 2004. *Oil extraction and Analysis Critical Issues and Comparative Studies*, chapter 8. AOCS Press, United States. Clark, J., D. Macquarrie, 2002. *Handbook of Green Chemistry and Technology*, chapter 17. Blackwell Science Ltd, London.

Macauley, S., McNeil, B., Harvey, L.M., 2001. The genus *Gluconobacter* and its applications in biotechnology. *Crit. Rev. Biotechnol.* 21, 1-25.

Mack Co., Easton, PA., 1980. *Pharmacopeia XX*.

Manso, L., 1980. Comparison of different methods for the analysis of total ascorbic acid in wheat flour. *EFCE Publ. Ser.*, 137-144.

Marez, M., Jehl, B., Madet, N., 2004. L'acide ascorbique et sont utilisation entant qu'additif dans les industries alimentaires. Université Paris XII, Val de Marne : Licence IUP SIAL, p23.

Marie Elisabeth Lucchesi, 2006, *Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles*, 37-48.

Martini el Bonsignore, Bwchem, Z., 273, 170, 1934, *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 9, 388, 1934.

Matthiessen, E., 1978. Bestimmung von Vitamin C in H-Milch durch direktauswertung des DS-chromatograms. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, 74, 403-407



Mayne, ST, 2003. « Nutriments antioxydants et les maladies chroniques : l'utilisation de biomarqueurs d'exposition et état de stress oxydatif dans la recherche épidémiologique. *Le Journal de la nutrition* 133 Suppl 3 : 940S. 933S PMID 12612179.

Mengal, P., B. Mompon, 1996. Procédé et installation d'extraction sans solvant de produits naturels par micro-ondes. Brevet Européen, EP 698 076 B1.

Meshall, J.A., Hassan, M.H.A., 1982. Citée dans Handbook of vitamins (MACKLIN J.L., Ed., 1984). *Anal. Profiles Drug Substances*, 11, 45.

Meurice, R., et asbl, D., 2009. Application des systèmes poison/antidote pour la stabilisation plasmidique chez les bactéries lactiques, HE Lucia de Brouckère.

Modelina, K.H., Flinks, J.M., 1982. Determination of ascorbic acid in plant food products by high performance liquid chromatography. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 15, 331-358.

Mottar, J., 1989. The usefulness of polypropylene for the aseptic packaging of orange juices. *Zeitschrift fuer Lebensmittel -Untersuchung und -Forschung*, 189 (2), 119-122.

Myriam, P., 2006. La carence de la vitamine c.

Naim, M., Schutz, O., Zehavi, U., Rouseff, R.L., Haleva-Toledo, E., 1997. Effects of orange juice fortification with thiols on p-vinylguaiacol formation, ascorbic-acid degradation, browning, and acceptance during pasteurization and storage under moderate conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (5), 1861-1867.

Nogami, I., Shirafuji, H., Oka, M., Yamaguchi, T., 1987. A method for producing 2-keto-l-gulonic acid. European Patent EP 221,707.

Obata, H., Tokuyama, T., 1982. Studies on the reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol by reductic acid using a stopped flow method. *Agr. Biol. Chem.*, 46, 1465-1468.

Obata, H., Tokuyama, T., Nitta, Y., Takagi, M., Hiromi, K., 1979. A stopped flow method for the determination of ascorbic acid in orange juice containing triose reductone. *Agric. Biol. Chem.*, 43, 2191-2192.

Otani, S., 1964. Protection against color changes of pharmaceutical preparations. V-Color formation of L-ascorbic acid in aqueous solutions. *Yakuzaigatu*, 24, 59-63.

Otsuka, M., Kurata, T., Arakawa, N., Inagaki, C., 1981. Separative determination of ascorbic acid and erythorbic acid in animal tissues by high performance liquid chromatography. *J. Nutr. Sei. Vitamino1.*, 27, 9-16.

Pachla, L.A., Kissinger, P.T., 1976. Determination of ascorbic acid in foodstuffs, pharmaceuticals and body fluids by liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal. Chem.*, 48, 364-367.

Paré, J.R.J., Sigouin, M., Lapointe, J., 1990. Extraction de produits naturels assistée par micro-ondes. Brevet européen, EP 398798.

Petrescu, S., Hulea, S.A., Stan, R., Avram, D., Herlea, V., 1992. A yeast strain that uses d-galacturonic acid as a substrate for l-ascorbic acid biosynthesis. *Biotechnol. Lett.* 14, 1-6.

Rao Manjula, Y., et Sureshkumar, G. K., 2000. Direct biosynthesis of ascorbic acid from glucose by *Xanthomonas campestris* through induced free-radicals, biochemical Engineering Group, Department of Chemical Engineering, Indian Institute of Technology, Bombay, Powai, Mumbai 400 076, India, *Biotechnology Letters* 22: 407-411.



Rassis, D., Saguy, I.S., 1995. Kinetics of aseptic concentrated orange juice quality changes during commercial processing and storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 30 (2), 191-198.

Reichstein, T., Grüssner A., 1934. Ergiebige Eine Synthese der l-Ascorbinsäure (vitamine C) Texte intégral via Cross Ref, *Helv. Chim. Acta* 17 (1934), p. 311-328.

Reichstein, T., Grussner, A., Oppenauer, R., 1933. Synthesis of D and L-ascorbic acids (vitamin C). *Nature* 132, 280.

Rizzolo, A., Forni, E., Polesello, A., 1984. HPLC assay of ascorbic acid in fresh and processed fruit and vegetable. *Food Chem.*, 14, 189-199.

Robinson et Stotz, J. Bioi. Chem., 160, 217 **Baldesten, A., Hjalmarsson, S.G., Neuman, G., 1978.** Isotachophoretic analysis of some organic acids in food. *Fresenius'Z. Anal. Chem.*, 290, 148-149.

Rose, R.C., Nahrwold, D.L., 1981. Quantitative analysis of ascorbic and dehydroascorbic acid by high performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 114, 140-145.

Roy, R.B., Conetta, A., Salpeter, J., 1976. Automated fluorometric method for the determination of total vitamin C in food products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 59, 1244-1250.

Rubach, K., Brey ER, C., 1980. Bestimmung von L(+) Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure in rück verdünnten citrus Konzentraten mittels Isotachophorese. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, 76, 228-231.

Rueckemann, H., 1980a. Methoden zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure mittels Hochleistungsflüssigchromatographie. I: Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Obst und Gemüse. *z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 171, 357-359.

Rueckemann, H., 1980b. Methoden zur Bestimmung von L-Ascorbinsäure mittels Hochleistungsflüssigchromatographie. II: Bestimmung von L-Ascorbinsäure in Milchenstauschfüttermitteln. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 171, 446-448.

Running, J., 1999. Process for the production of ascorbic acid with *Prototheca*. US Patent 5,900,370.

Running, J.A., Burlingame, R.P., Berry, A., 2003. The pathway of l-ascorbic acid biosynthesis in the colourless microalga *Protothecamoriformis*. *J. Exp. Bot.* 54, 1841-1849.

Running, J.A., Huss, R.J., Olson, P.T., 1994. Heterotrophic production of ascorbic acid by microalgae. *J. Appl. Phycol.* 6, 99-104.

Running, J.A., Severson, D.K., Schneider, K.J., 2002. Extracellular production of l-ascorbic acid by *Chlorella protothecoides*, *Prototheca* species, and mutants of *P. moriformis* during aerobic culturing at low pH. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29, 93-98.

Saito, Y., Ishii, Y., Hayashi, H., Imao, Y., Akashi, T., Yoshikawa, K., Noguchi, Y., Soeda, S., Yoshida, M., Niwa, M., Hosoda, J., Shimomura, K., 1997. Cloning of genes coding for l-sorbose and l-sorbose dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* and microbial production of 2-keto-l-gulonate, a precursor of l-ascorbic acid, in a recombinant *G. oxydans* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 454-460.

Saito, Y., Ishii, Y., Hayashi, H., Yoshikawa, K., Noguchi, Y., Yoshida, S., Soeda, S., Yoshida, M., 1998. Direct fermentation of 2-keto-l-gulonate in recombinant *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnol. Bioeng.* 58, 309-315.



Sattar, A., Durrani, M.J., Khan, R.N., Hussain, B.H., 1989. Effect of packaging materials and fluorescent light on HTST-pasteurized orange drink. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung*. 188 (5), 430-433.

Shaw, P.E., Wilson, C.W., 1982. Ascorbic acid content of some tropical fruit products determined by high performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 30, 394-396.

Shibata, T., Ichikawa, C., Matsuura, M., Takata, Y., Noguchi, Y., Saito, Y., Yamashita, M., 2000. Metabolic engineering study on the direct fermentation of 2-keto-l-gulonic acid, a key intermediate of l-ascorbic acid in *Pseudomonas putida* IFO 3738. *J. Biosci. Bioeng.* 90, 223–225.

Shigeoka, S., Nakano, Y., Kitaoka, S., 1979. The biosynthetic pathway of l-ascorbic acid in *Euglena gracilis* Z. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 25, 299–307.

Shinjoh, M., Tomiyama, N., Asakura, A., Hoshino, T., 1995. Cloning and nucleotide sequencing of the membrane-bound l-sorbose dehydrogenase gene of *Acetobacter liquefaciens* IFO 12258 and its expression in *Gluconobacter oxydans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 413–420.

Singh, J., Upadhyay, A.K., Bahadur, A., Singh, B., Singh, K.P., Rai, M., 2006. *Sci. Hortic.* 108 233.

Skatrud, T.J., Huss, R.J., 1991. l-Ascorbic acid production in microorganisms. US Patent 5,001,059.

Solomon, O., Svanberg, U., Sahlström, A., 1995 Effect of oxygen and fluorescent light on the quality of orange juice during storage at 8°C. *Food Chemistry*, 53 (4), 363-368.

Sonoyama, T., Tani, H., Matsuda, K., Kageyama, B., Tanimoto, M., Kobayashi, K., Yagi, S., Kyotani, H., Mitsushima, K., 1982. Production of 2-keto-l-gulonic acid from d-glucose by two-stage fermentation. *Appl. Env. Microbiol.* 43, 1064–1069.

Sood, S.P., Sartori, L.E., Wittmer, D.P., Haney, W.G., 1976. High performance liquid chromatographic determination of ascorbic acid in selected foods and multivitamin products. *Anal. Chem.*, 48, 796-798.

Speek, A.J., Schrijver, J., Schreurs, W.H.P., 1984. Fluorometric determination of total vitamin C and total isovitamin C in foodstuffs and beverages by high performance liquid chromatography with precolumn derivatization. *J. Agric. Food Chem.*, 32, 352-355.

Spiro, M., Chen, S.S., Flavour, Fragrance, 1995. Kinetics of isothermal and microwave extraction of essential oil constituents of peppermint leaves into several solvent systems. *Journal*, 10, 259-272.

Steele, L., Jadhav, S., Khadziyev, D., 1976. The chemical assay of vitamin C in dehydrated mashed potatoes. *Food Sei. Technol.*, 9, 239-245.

Stevanato, R., Avigliano, L., Finazzi-Agrò, A., Rigo, A., 1985. Determination of ascorbic acid with immobilized green zucchini ascorbate oxidase. *Analytical Biochemistry*, Vol. 149, pp.537 - 542.104.

Sugisawa, T., Hoshino, T., Masuda, S., Nomura, S., Setoguchi, Y., Tazoe, M., Shinjoh, M., Someha, S., Fujiwara, A., 1990. Microbial production of 2-keto-l-gulonic acid from l-sorbose and d-sorbitol by *Gluconobacter melanogenus*. *Agric. Biol. Chem.* 54, 1201–1209.

Tak, PP, Zvaifler, NJ, vert, DR, Firestein, GS, 2000. « La polyarthrite rhumatoïde et p53 : comment le stress oxydatif pourrait modifier le cours des maladies inflammatoires ». *Immunologie aujourd'hui* 21 (2) : 78-82. Doi : 10.1016/S0167-5699 (99) 01552-2. PMID 10652465.



Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A., Sokmen, A., 2006. Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chem.*, 95: 200-204.

Tilimanns, 1927. *Untersuch. Lebensm.*, 54, 33.

Tonelli, D., Budini, R., Girotti S., 1980. Determination of L-ascorbic acid in fruits and vegetables. *Ann. Chim.*, 70, 111-117.

Tono, T., Fujita, S., 1981. Determination of ascorbic acid in foods by the spectrophotometric method based on difference spectra, *Agric. Biol. Chem.*, 45, 2947-2950.

Tono, T., Fujita, S., 1982. Spectrophotometric determination based on difference spectra of L-ascorbic acid in plant and animal foods. *Agric. Biol. Chem.*, 46, 2953-2959.

Tsuda, T., Fukuda, H., 1986. Determination of L-ascorbic acid in tomato by isotachoelectrophoresis. Application of computer simulation system for setting of determination conditions to avoid the mixed zone problem. *J. Nutr. Vitaminol.*, 32, 307-315.

Urbance, J.W., Bratina, B.J., Stoddard, S.F., Schmidt, T.M., 2001. Taxonomic characterization of *Ketogulonigenium vulgare* gen.nov., sp. nov. and *Ketogulonigenium robustum* sp. nov., which oxidize l-sorbose to 2-keto-l-gulonic acid. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1059–1070.

Vanderslice, J.T., Higgs, D.J., 1984. HPLC analysis with fluorometric detection of vitamin C in food samples. *J. Chromatogr. Sci.*, 22, 488-489.

Vasileva-Aleksandrova, P., Neicheva, A., 1979. Spektral photometrische Bestimmung von L-Ascorbinsäure mit 2,2',5',5'-tetra-(4-nitrophenyl)-3,3'-(3,3-dimethoxy-4,4'-biphenyl) ditetraazoliumchlorid. *Mikrochim. Acta*, II, 337-342.

Veazey, R.L., Niemann, T.A., 1980. Chemiluminescence high performance liquid chromatography detector applied to ascorbic acid determinations. *J. Chromatogr.*, 200, 153-162.

Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. D., 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 4113–4117.

Visser, F.R., 1984. Some effect of replacement of metaphosphoric acid/acetic acid solvent system with trichloroacetic acid in microfluorometric determination of vitamin C. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 67, 1020-1022.

Watada, A.E., 1982. A HPLC method for determining ascorbic acid content of fresh fruits and vegetables. *Hort. Science*, 334-335.

Wheeler, G.L., Jones, M.A., Smirnoff, N., 1998. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393, 365–369.

Wimalasiri, P., Wills, R.B.H., 1983. Simultaneous analysis of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in fruits and vegetables by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 256, 368-371.

Xu, A., Yao, J., Yu, L., Lv, S., Wang, J., Yan, B., Yu, Z., 2004. Mutation of *Gluconobacter oxydans* and *Bacillus megaterium* in a two-step process of l-ascorbic acid manufacture by ion beam. *J. Appl. Microbiol.* 96, 1317–1323.

Yuan, J.P., Chen, F., 1998. Degradation of ascorbic acid in aqueous solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (12), 5078-5082.



Yurena Hernandez, M. Gloria Lobo, Monica Gonzalez, 2005. Analytical, Nutritional and Clinical Methods, Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods Plant Physiology Laboratory, Department of Tropical Fruits, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, Apdo.

Zhang, X., D. Hayward, 2006. Applications of microwave dielectric heating in environment-related heterogeneous gas-phase catalytic systems. *Inorganica Chimica Acta*, 359, 3421–3433.

Zilva, S.S., Wells, F.M., 1919. Citée dans Handbook of vitamins (Machlin J.L., Ed. 1984). *Proc. R. Soc. (Bio1.)*, 90, 505.

Zinsheng, Y., Zengxin, T., Longhua, Y., Guanghin, Y., Wenzhu, N., Changhui, W., Shuding, W., Huifeng, J., Jufen, Y., Mingshou, W., Xiuju, Y., 1981. Studies on production of vitamin C precursor-2-keto-l-gulonic acid from l-sorbose by fermentation. II. Conditions for submerged fermentation of 2-keto-l-gulonic acid. *Acta Microbiol. Sin.* 21, 185–191.





ANNEXES



Tableau 1 : Effets des facteurs physicochimiques sur les vitamines liposolubles et hydrosolubles.

<i>Vitamines Liposolubles</i>	<i>Acidité (pH<5)</i>	<i>Basicité</i>	<i>UV- Lumière</i>	<i>Oxygène- Air</i>	<i>Chaleur</i>
<i>A</i>	++	0	++	++	++
<i>β-carotène</i>	+	0	++	++	+
<i>D₃(cholécalférol)</i>	+	+	++	++	0
<i>E (α-tocophérol)</i>	0	0	++	+	0



<i>Vitamines hydrosolubles</i>	<i>Acidité (pH<5)</i>	<i>Basicité</i>	<i>UV- Lumière</i>	<i>Oxygène- Air</i>	<i>Chaleur</i>
<i>C</i>	<i>0</i>	<i>+++</i>	<i>++</i>	<i>+++</i>	<i>+</i>
<i>B₁(thiamine)</i>	<i>0</i>	<i>+++</i>			<i>++</i>
<i>B₂(riboflvine)</i>	<i>0</i>	<i>++</i>	<i>+++</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>PP(niacine)</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>+</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>B₅(pantothénate)</i>	<i>+++</i>	<i>+</i>	<i>(0)</i>	<i>(0)</i>	<i>+</i>
<i>B₆</i>	<i>0</i>	<i>++</i>	<i>+</i>	<i>0</i>	<i>++</i>
<i>B₈(biotine)</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>B₉(folates)</i>	<i>+++</i>	<i>0</i>	<i>++</i>	<i>++</i>	<i>++</i>
<i>B₉ si présence de vitamine c en excès</i>			<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>B₁₂ (cobalamine)</i>	<i>0</i>	<i>++</i>	<i>+</i>	<i>(0)</i>	<i>+</i>

Effet délétère :

- 0 : aucun ;
- (0) : faible ;
- + : moyen ;
- ++ : élevé ;
- +++ : très élevé.

