



**HAL**  
open science

# Du champ à l'ingrédient naturel : caractérisation des co-produits de grenade occitane pour leur valorisation

Alexandra Lamotte

## ► To cite this version:

Alexandra Lamotte. Du champ à l'ingrédient naturel : caractérisation des co-produits de grenade occitane pour leur valorisation. Sciences du Vivant [q-bio]. INP DE TOULOUSE, 2023. Français. NNT: . tel-04187753v1

**HAL Id: tel-04187753**

**<https://hal.inrae.fr/tel-04187753v1>**

Submitted on 24 May 2023 (v1), last revised 25 Aug 2023 (v2)

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

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

**Délivré par :**

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

**Discipline ou spécialité :**

Sciences des Agroressources

---

**Présentée et soutenue par :**

Mme ALEXANDRA LAMOTTE

le vendredi 24 février 2023

**Titre :**

Du champ à l'ingrédient naturel : caractérisation des co-produits de grenade occitane pour leur valorisation

---

**Ecole doctorale :**

Sciences de la Matière (SDM)

**Unité de recherche :**

Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle ( LCA)

**Directeur(s) de Thèse :**

MME CHRISTINE RAYNAUD

MME MARION ALIGNAN

**Rapporteurs :**

M. YANIS CARO, UNIVERSITE DE LA REUNION

**Membre(s) du jury :**

M. JEAN-MATHURIN NZIKOU, UNIVERSITE MARIEN NGOUABI BRAZZAVILLE, Président

MME CHRISTINE RAYNAUD, TOULOUSE INP, Membre

MME GENEVIÈVE NGUYEN, TOULOUSE INP, Membre

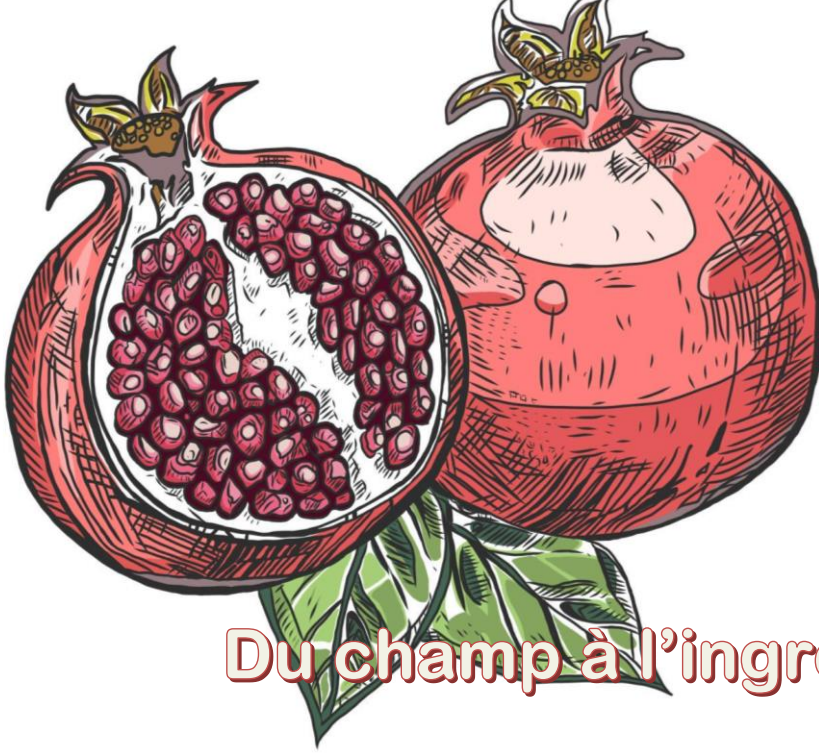
MME MARION ALIGNAN, TOULOUSE INP, Membre

MME VALÉRIE OLIVIER, TOULOUSE INP, Invité(e)

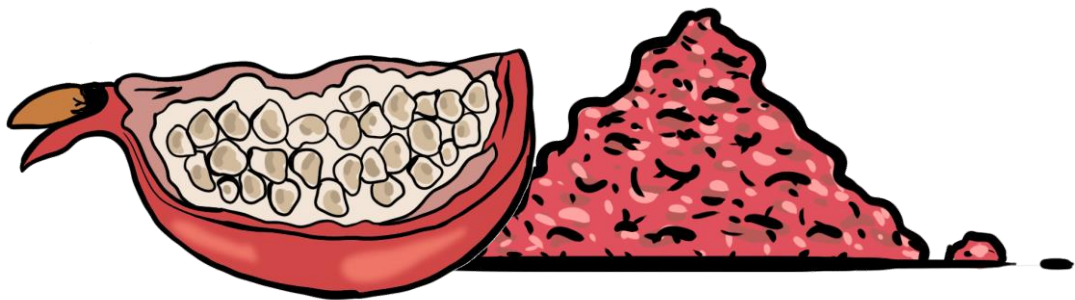
M. PIERRE GIOVANELLI, SiBio!, Invité(e)

M. SOULAIMAN SAKR, INSTITUT AGRO RENNES, Membre





**Du champ à l'ingrédient naturel :**  
**caractérisation des co-produits de**  
**grenade occitane pour leur**  
**valorisation**





## Remerciements

Avant de commencer la thèse, je pensais que ces travaux seraient l'opportunité d'apprendre beaucoup sur un sujet, d'affiner mes compétences scientifiques et de résoudre de multiples difficultés. En auditionnant pour cette thèse et puis tout au long de ce projet, je me suis aussi rendu compte que les axes de recherche pouvaient être choisis en fonction des besoins des acteurs qui ont besoin de certaines solutions. Au départ, je n'aurais jamais pensé me retrouver dans l'univers du code et des statistiques, et pour finir, je pense poursuivre ma carrière dans ce domaine.

Ces travaux n'auraient pu être effectués sans le soutien de la région Occitanie et de l'Union Européenne à travers le financement FEDER, et du Laboratoire de Chimie Agro-industrielle (LCA). Je tiens donc à remercier la direction du LCA, Sophie Thiebaut-Roux et Pierre-Yves Pontalier, précédés par Gérard Vilarem et Carlos Vaca-Garcia, pour leur accueil et leur soutien, spécialement dans le contexte de la crise sanitaire qui nous a tous pris de court.

J'adresse mes sincères remerciements à Jean-Mathurin Nzikou, pour son avis éclairé et sa rigueur, ainsi qu'à Yanis Caro, pour ses remarques très constructives. A tous les deux, merci pour la relecture de mes travaux et pour nos échanges. Je tiens aussi à remercier Geneviève Nguyen et Soulaïman Sakr, pour vos points de vue originaux qui ont donné lieu à des discussions très intéressantes. Merci aux autres membres invités du jury qui m'ont aussi accompagnée pendant une partie de la thèse : Pierre Giovanelli, Zéphirin Mouloungui, Valérie Olivier, et Gérard Vilarem.

Je n'en serais pas là aujourd'hui sans mes directrices de thèse, Christine Raynaud et Marion Alignan. Christine, merci d'avoir accepté de reprendre la direction en cours de route, tu as apporté du recul sur les travaux, et surtout du soutien quand je croulais littéralement sous les données, à ne pas savoir quoi en faire. Marion, tu as été d'une aide sans faille du début à la fin et j'ai toujours pu compter sur toi, merci. Tu m'as accordé ta confiance pour avancer sur le projet avec beaucoup d'autonomie et tu m'as appris énormément professionnellement et personnellement.

Je remercie aussi tous les partenaires du projet GIMMS. Tout d'abord Pierre Giovanelli, sans qui le projet n'aurait probablement pas vu le jour. Ton expertise et ton implication en tant qu'acteur de l'agriculture et la transformation n'ont pas d'égal, ça a été un vrai plaisir de travailler avec toi. Toutes les personnes de l'équipe ODYCEE, en particulier Valérie Olivier et Gaëtan Girard, nos échanges tout au long du projet nous ont beaucoup apporté mutuellement, que ce soit au cours de réunions ou au restaurant au bord de la plage après les séminaires. Gaëtan, ton pragmatisme et tes talents de communicant sont sans pareils, je sais qu'actuellement tu es dans le dur de la thèse mais ça va aller !

Merci aussi à tous les membres du LCA, permanents ou non, pour votre bienveillance et votre aide.

Anne Lung, tu es la base du labo (sans toi je pense que beaucoup de manipulations ne marcheraient pas), merci pour ta rigueur et ta gentillesse. Laure Candy, le trajet pour rentrer à la maison passait beaucoup plus vite avec toi, merci pour tout (et dis-moi quand tu reviens dans le coin !). Lupita Guadalupe Vaca Medina, merci pour nos

échanges qui ont toujours été plus que constructifs et bénéfiques, tu apportes énormément aux séminaires des doctorants (de mon point de vue). Céline Mathieu (même si tu es partie depuis un moment je te range dans la catégorie du labo quand même), merci de m'avoir accompagnée sur la technique mais aussi sur l'humain. Muriel Cerny, Mumu, merci d'avoir partagé ton savoir-faire et (surtout) ta sérénité en toutes circonstances. Ingrid Pelletier, tu m'as épaulée comme personne, merci pour tous nos fous rires pendant qu'on faisait « les fruits ». Romain Armengau, sans toi les pauses n'avaient pas la même saveur (ce n'était pas le même café...), merci pour nos discussions qui me permettaient de penser (un peu) à autre chose.

Ces quatre années n'auraient pas été pareilles sans tous les doctorants du labo (pour certains maintenant docteurs) : Luce, Elise, Pauline, Jérôme, Elliott, Chris, Laura, Nga, Victor, Aya, Laurent, Margaux, Paul, Gabi, Nico, Ale, Huy, Julia, Rozenn, et Mo.

Lucerito, je crois que la seule chose que je regrette de la thèse c'est que tu aies été dans le bureau de Virginie quand je suis arrivée... Merci d'avoir été là pendant toute cette aventure, pour tes conseils et ta joie, et de m'avoir appris le « vrai » espagnol (version polie). Elise, on était tellement ensemble H24 que c'est comme si on se connaissait depuis toujours. Merci d'avoir tout partagé, les rires, les larmes, le make-up, les soirées, les balades, les urgences véto ou humaines les week-ends... Les filles, on a créé le « bureau de filles », notre cocon, le lieu de toutes les discussions et schémas au tableau, ou des « repas » de 10 mins entre deux manips. Chris, je t'admire depuis le premier jour, j'ai l'impression que tu connais tout et que tu sais tout faire : papa, chercheur, doctorant, danseur, musicien... Tu es même dans la team handicap ?! Merci pour tout. Margaux, depuis qu'on s'est rencontrées tu m'impressionnes, j'envie ta volonté et ta détermination. Merci pour ton empathie, ton écoute et ton soutien. Laurent, j'ai failli t'envoyer un message pour savoir quoi dire dans mes remerciements... Ça veut tout dire, non ? Un remerciement spécial : merci d'avoir été le premier lecteur de ma thèse. Merci aussi pour tous nos échanges sur la vie, l'écologie (et un peu le boulot).

Je souhaite aussi remercier tous mes proches, de près ou de loin, pour leur soutien indéfectible avant, pendant et après cette étape importante de mon cheminement.

Merci à tous les copains rencontrés grâce à la thèse : Julien, Guillaume, Emilie, Emma, et Romaric. Julien, merci pour ta bonne humeur, tes photos (les plus belles) et tes illustrations. Guillaume, merci d'avoir partagé les pauses et les sessions Pech David, et merci Emilie pour toutes tes attentions trop mimi. Emma, merci pour « Vroum vroum » et tous les fous rires. Romaric, merci pour ton humour et tous tes gadgets (oui l'imprimante 3D en est un...).

Merci Armand, Caro, et Matthou. Grâce à vous la vie à Toulouse était encore plus rose (...). Merci d'avoir été là pour les concerts, les restos, le skate, les soirées du nouvel an, la musique, et j'en passe. Merci Ambrose et Lucas d'avoir toujours répondu présents quand j'avais besoin de prendre l'air (et de voir les loulous j'avoue). Merci Marlayna, Romain, Rodolphe, Jerem et Julliane. Vous avez été là bien avant que tout ça commence, sans vous je n'en serais pas là aujourd'hui. Merci aux copains de Grenoble : Marine, Aless, Jo, Péponne et Bruno. Vous vous êtes toujours débrouillés

pour qu'on puisse se voir à la dernière minute parce que je ne savais jamais quand je rentrais. Marinette, je pense que je pourrais écrire un roman sur tout ce que tu m'as apporté et m'apporte encore aujourd'hui. Merci de m'avoir rassurée et soutenue tout au long du doctorat. Alessou, merci d'avoir toujours été présente pour les appels n'importe quand et n'importe où, c'est tellement apaisant de te connaître.

Je remercie aussi ma famille, tout d'abord parce que vous êtes presque plus fiers de moi que je ne le suis. Merci Papou de m'avoir accueillie à mes retours de Toulouse, de m'avoir appris à solutionner tous les problèmes possibles et d'en avoir résolu pour moi quand je ne le pouvais pas. Merci Mams de toujours penser à prendre des nouvelles, de t'inquiéter quand j'en ai besoin et de toujours être de bon conseil (même quand je parle de chimie). Merci Xav de me demander bientôt tous les jours de t'expliquer l'atomistique, et de me rappeler qu'on trouve la science dans la vie de tous les jours. Mon bébé sœur, Léa, je ne sais pas ce que je ferais sans toi, et encore plus à la fin tu étais tellement bienveillante et juste...présente. J'espère que je pourrais te rendre la pareille.

Paul, on s'est connu au début de mon aventure et tu as été là tout le long. Tu sais mieux que personne (et peut-être que moi) ce que ça fait de s'impliquer dans un projet de thèse, et tu étais presque plus content que moi de la soutenance. Je te le dis et le répète, tu es mon pilier, je pense qu'on peut tout surmonter ensemble (avec Sinaloa et Rock).

Merci à tous, j'espère avoir montré à quel point la présence de personnes bienveillantes et à l'écoute a été cruciale pour mener à bien ce doctorat.





## Sommaire

Remerciements.....	v
Sommaire.....	ix
Liste des figures.....	xiii
Liste des tableaux.....	xix
Liste des abréviations.....	xxiii
Introduction.....	25
1. État de l'art.....	27
1.1. Le Grenadier.....	29
1.2. La Grenade.....	32
1.3. Composés bioactifs des co-produits de grenade.....	35
1.3.1. Co-produit de pressage des graines.....	35
1.3.2. Péricarpes.....	39
1.3.3. Conclusion.....	45
1.4. Extraction des composés ciblés des co-produits de grenade.....	46
1.4.1. Extraction des lipides des co-produits de pressage des graines.....	46
1.4.2. Facteurs influençant l'extraction des polyphénols des péricarpes.....	52
1.4.3. Conclusion.....	59
1.5. Paramètres influençant la composition chimique des co-produits de grenade.....	60
1.5.1. Facteurs pré-récolte.....	60
1.5.2. Facteurs post-récolte.....	65
1.5.3. Conclusion.....	79
1.6. Conservation des huiles et des extraits des co-produits de grenade.....	80
1.6.1. Stabilités des extraits de péricarpes.....	80
1.6.2. Stabilité de l'huile de grenade.....	82
1.6.3. Encapsulation.....	83
1.6.4. Conclusion.....	87
1.7. Conclusion.....	88
1.8. Verrous scientifiques et objectifs des travaux.....	88
2. Matériel et méthodes.....	93
2.1. Réactifs et solvants.....	95
2.2. Matériel végétal.....	95
2.2.1. Matériel végétal pour l'évaluation de l'impact des conditions de culture (chapitre 3).....	96
2.2.2. Matériel végétal pour l'évaluation de l'impact des conditions de conservation (chapitre 4) .....	100
2.2.3. Matériel végétal pour l'évaluation de l'impact des conditions de conditionnement (chapitre 5).....	104
2.3. Caractérisation physique et qualitative des fruits.....	107

2.4. Caractérisation physico-chimique des co-produits .....	109
2.4.1. Teneur en matière sèche .....	109
2.4.2. Étude des composés phénoliques de péricarpes .....	110
2.4.3. Étude des acides gras issus des co-produits de pressage des graines .....	113
2.5. Analyse des données .....	116
3. Étude de l'impact des conditions de culture des grenades sur les composés à valeur ajoutée de leurs co-produits .....	119
3.1. Caractérisation qualitative des grenades et de leurs co-produits .....	121
3.1.1. Caractéristiques variétales .....	121
3.1.2. Effets du traitement sur la masse et la couleur des fruits.....	124
3.1.3. Effets des conditions de culture sur les volumes de co-produits .....	126
3.2. Caractérisation chimique des co-produits de transformation des grenades .....	127
3.2.1. Péricarpes .....	127
3.2.2. Co-produits de pressage de graines .....	132
3.3. Influence des conditions de culture sur les teneurs en composés à valeur ajoutée des co-produits de transformation des grenades .....	136
3.3.1. Influence des conditions de culture sur les polyphénols des péricarpes .....	136
3.3.2. Influence des conditions de culture sur les lipides des co-produits de pressage des graines .....	161
3.4. Conclusion .....	186
4. Étude de l'impact des conditions de conservation des fruits sur la teneur en composés à valeur ajoutée des co-produits .....	193
4.1. Caractérisation qualitative des grenades et de leurs co-produits .....	195
4.1.1. Caractéristiques variétales .....	195
4.1.2. Évolution des caractéristiques qualitatives au cours de la conservation.....	199
4.1.3. Conclusion.....	222
4.2. Influence des conditions de conservation des grenades sur les teneurs en composés à valeur ajoutée des co-produits de transformation des grenades.....	223
4.2.1. Influence des conditions de conservation des grenades sur les polyphénols des péricarpes .....	224
4.2.2. Influence des conditions de conservation sur les lipides des co-produits de pressage des graines .....	257
4.3. Conclusion .....	275
5. Étude de l'impact du conditionnement des co-produits sur la teneur en composés à valeur ajoutée .....	277
5.1. Effet de l'ensilage des co-produits de grenade sur leur composition chimique.....	280
5.1.1. Introduction .....	280
5.1.2. Material and methods .....	282
5.1.3. Results and discussion.....	285
5.1.4. Conclusion.....	295
Appendix. Supplementary material .....	297

5.2. Étude de la stabilisation des co-produits de grenade : impact sur leur composition chimique .....	299
5.2.1. Péricarpes .....	299
5.2.2. Co-produit de pressage des graines .....	305
5.3. Diminution de la durée de séchage par voie thermique des co-produits de pressage des graines.....	310
5.3.1. Étude de l'impact du séchage en étuve ventilée .....	310
5.3.2. Étude de l'impact du séchage en sécheur à tapis .....	314
5.4. Conclusion .....	320
Conclusion générale.....	323
Annexe .....	331
Travaux préliminaires .....	331
Évolution des températures moyennes et maximales pendant la fructification des grenades et corrélation avec la teneur en punicalagine des péricarpes de grenade.....	335
Évolution des températures moyennes et maximales pendant la fructification des grenades et corrélation avec les teneurs en acides punicoïque et $\beta$ -éléostéarique des co-produits de pressage des grenades .....	338
Bibliographie .....	343



## Liste des figures

Figure 1.1 : « Évolution de la température moyenne en surface [...] fondée sur des projections multimodèles moyennes pour la période 2081–2100 par rapport à la période 1986–2005, selon les scénarios d'évolution des concentrations de gaz à effet de serre RCP (Representative Concentration Pathway) RCP2,6 (à gauche) et RCP8,5 (à droite).....	29
Figure 1.2 : Culture de la grenade dans le monde.....	30
Figure 1.3 : Anatomie de la grenade. ....	33
Figure 1.4 : Co-produits générés par les procédés de transformation des grenades.....	34
Figure 1.5 : Principaux polysaccharides des co-produits de pressage des graines de grenades : xylane (A), cellulose (B), et pectine (C). ....	36
Figure 1.6 : Structure du triglycéride majoritaire de l'huile de grenade comportant trois chaînes d'acide punique (acide 9Z,11E,13Z-octadéca-9,11,13-trièneoïque).....	37
Figure 1.7 : Structures chimiques du glucose (A) et du fructose (B).....	40
Figure 1.8 : Familles de polyphénols présents dans les péricarpes de grenade.....	42
Figure 1.9 : Structures de la punicalagine (A) et de la punicaline (B). ....	43
Figure 1.10 : Exemple d'appareillage pour l'extraction de l'huile à froid.....	47
Figure 1.11 : Extraction par Soxhlet. ....	48
Figure 1.12 : Extraction assistée par ultrasons.....	49
Figure 1.13 : Schéma de l'extraction par fluide supercritique (SFE) proposé par Liu et al. [156].....	51
Figure 1.14 : Facteurs principaux influençant l'extraction des polyphénols des péricarpes de grenades. ....	53
Figure 1.15 : Morphologie de 9 échantillons de grenade de 8 variétés cultivées dans plusieurs parcelles de la région d'Alicante, Espagne.. ....	61
Figure 1.16 : Morphologie du fruit du grenadier (variété Mollar de Elche) au cours de son développement. ....	64
Figure 1.17 : Impact de la température de conservation des grenades et des co-produits sur les polyphénols et lipides. ....	67
Figure 1.18 : Diagramme de stabilité de la matière organique avec l'activité de l'eau. ....	71
Figure 1.19 : Évolution de l'abondance relative des populations bactériennes au cours de l'ensilage des co-produits d'artichauts.....	75
Figure 1.20 : Dégradation des cellules parenchymateuses des graines de grenades par micro-onde (261 W, 102 s).....	77
Figure 1.21 : Dégradation des péricarpes de grenades par prétraitement enzymatique. ....	78
Figure 1.22 : Résumé des objectifs des travaux de thèse. ....	90

Figure 2.1 : Schéma général des méthodes employées dans les travaux de thèse. ....	95
Figure 2.2 : Photo des grenades de la variété Mollar de Elche non traitées (localisation Du) à réception, vue d'ensemble (A), coupe longitudinale (B) et transversale (C). ....	96
Figure 2.3 : Photo des grenades de la variété Provence non traitées (localisation Du) à réception, vue d'ensemble (A), coupe longitudinale (B) et transversale (C). ....	97
Figure 2.4 : Localisation et informations sur les parcelles de culture des grenades incluses dans l'étude. ....	97
Figure 2.5 : Grenades Mollar de Elche et Valenciana.....	101
Figure 2.6 : Schéma récapitulatif des méthodes de conservation des grenades mises en place. ....	101
Figure 2.7 : Chaîne de transformation des grenades de l'atelier SiBio! : séparation des graines et péricarpes. ....	104
Figure 2.8 : Chaîne de transformation des grenades de l'atelier SiBio! : pressage des graines. ....	104
Figure 2.9 : Déshydratation des co-produits de grenade avec une étuve ventilée.....	105
Figure 2.10 : Déshydratation des co-produits de pressage des graines de grenade avec un sécheur à tapis industriel en continu. ....	106
Figure 2.11 : Profil d'acides gras des standards "Mix 37" (A) et des huiles de grenade (B), tung (C) et catalpa (D) commerciales. ....	115
Figure 3.1 : Photos des lots de grenades issus des itinéraires de culture par variété (Mollar de Elche ou Provence), localisation des parcelles (Be, Co, Du, Pu, Re, Sa) et traitement contre éclatement (Non traité, Traité). ....	122
Figure 3.2 : Évolution de la masse et des coordonnées de l'espace de couleur CIEL *a*b* des grenades en fonction de la variété et du traitement. ....	123
Figure 3.3 : Évolution de la proportion des co-produits (péricarpes ou co-produits de pressage des graines) et du jus en fonction de la variété et du traitement.....	126
Figure 3.4 : Rendement en extractibles des péricarpes de grenade par variété, lieu de production, et traitement. ....	128
Figure 3.5 : Teneurs en polyphénols totaux des péricarpes de grenades par variété, lieu de production, et traitement. ....	128
Figure 3.6 : Teneurs en punicalagine, punicaline et acide ellagique des péricarpes de grenades par variété, lieu de production, et traitement. ....	129
Figure 3.7 : Rendement en huile des co-produits de pressage des graines de grenades par variété, lieu de production, et traitement.....	132
Figure 3.8 : Teneur relative des principaux acides gras identifiés des co-produits de pressage des graines de grenades par variété, lieu de production, et traitement. ....	134
Figure 3.9 : Relations entre le rendement en extractibles et les teneurs en polyphénols totaux, punicalagine, punicaline et acide ellagique des péricarpes de grenades. ....	138
Figure 3.10 : Effet de la variété sur le rendement en extractibles et les teneurs en polyphénols totaux, punicalagine, punicaline et acide ellagique des péricarpes de grenades. ....	140

Figure 3.11 : Effet de la localisation des parcelles sur le rendement en extractibles et les teneurs en polyphénols totaux, punicalagine, punicaline et acide ellagique des péricarpes de grenades. ....	142
Figure 3.12 : Effet du traitement foliaire sur le rendement en extractibles et les teneurs en polyphénols totaux, punicalagine, punicaline et acide ellagique des péricarpes de grenades. ....	144
Figure 3.13 : Effet de la variété sur la teneur en punicalagine des péricarpes de grenades..	147
Figure 3.14 : Effet de la localisation des vergers sur la teneur en punicalagine des péricarpes de grenades.....	150
Figure 3.15 : Relation entre la teneur en punicalagine des péricarpes de grenades non traitées (B) et traitées (C) et les températures ambiantes minimales mesurées sur les parcelles (A). ....	154
Figure 3.16 : Effet du traitement foliaire contre l'éclatement sur la teneur en punicalagine des péricarpes de grenades. ....	155
Figure 3.17 : Liaisons entre le rendement en huile et les teneurs en acides gras des co-produits de pressage des graines. ....	164
Figure 3.18 : Effet de la localisation des parcelles sur le rendement en huile et les teneurs en acides gras des co-produits de pressage des graines. ....	166
Figure 3.19 : Effet de la variété de grenade sur le rendement en huile et les teneurs en acides gras des co-produits de pressage des graines. ....	168
Figure 3.20 : Effet du traitement foliaire sur le rendement en huile et les teneurs en acides gras des co-produits de pressage des graines. ....	169
Figure 3.21 : Effet de la variété sur la teneur en acide punique des co-produits de pressage des graines de grenades.....	173
Figure 3.22 : Effet des conditions pédoclimatiques sur la teneur en acide punique des co-produits de pressage des graines de grenades. ....	174
Figure 3.23 : Effet du traitement foliaire sur la teneur en acide punique des co-produits de pressage des graines de grenades. ....	175
Figure 3.24 : Effet de la variété sur la teneur en acide $\beta$ -éléostéarique des co-produits de pressage des graines de grenades. ....	176
Figure 3.25 : Effet des conditions pédoclimatiques sur la teneur en acide $\beta$ -éléostéarique des co-produits de pressage des graines de grenades. ....	177
Figure 3.26 : Effet du traitement foliaire sur la teneur en acide $\beta$ -éléostéarique des co-produits de pressage des graines de grenades. ....	178
Figure 3.27 : Rôles des familles d'acides gras insaturés à 18 carbones dans les plantes.....	180
Figure 3.28 : Voie de biosynthèse simplifiée de l'acide punique.....	182
Figure 4.1 : Grenades des variétés Mollar de Elche et Valenciana avant conservation. ....	196
Figure 4.2 : Comparaison de la masse, la couleur et l'aspect des variétés étudiées Mollar de Elche (n=202) et Valenciana (n=250) avant conservation (témoin). ....	197
Figure 4.3 : Proportions de co-produits générés à partir des grenades des variétés étudiées Mollar de Elche (n=10) et Valenciana (n=10) avant conservation (témoin).....	198



Figure 4.4 : Effet de la durée de conservation sur la masse des grenades de la variété Mollar de Elche (n=16 et 8).	200
Figure 4.5 : Effet de la conservation des grenades Valenciana sur leur masse (n=20 et 10).	201
Figure 4.6 : Effet de la condition de conservation des grenades Mollar de Elche sur leur couleur à chaque semaine de conservation pendant 4 et 8 semaines (n=16 et 8).	209
Figure 4.7 : Effet de la condition de conservation des grenades Valenciana sur leur couleur à chaque semaine de conservation pendant 4 et 8 semaines (n=20 et 10).	210
Figure 4.8 : Grenades Valenciana conservées jusqu'à 4 et 8 semaines à température ambiante et humidité ambiante ("S02") ou contrôlée ("S03").	211
Figure 4.9 : Évolution des composantes chromatiques ( $a^*$ et $b^*$ ) et de luminance ( $L^*$ ) des grenades Valenciana conservées jusqu'à 4 et 8 semaines à température ambiante et humidité ambiante ("S02") ou contrôlée ("S03").	212
Figure 4.10 : Altérations d'origine physiologique ou microbienne, par craquement ou par éclatement des grenades Mollar de Elche et Valenciana au cours de leur conservation.	216
Figure 4.11 : Relations entre le rendement d'extraction et les teneurs en polyphénols totaux, punicalagine, punicaline et acide ellagique des péricarpes des grenades.	230
Figure 4.12 : Comparaison du rendement d'extraction et des teneurs en polyphénols totaux, punicalagine, punicaline et acide ellagique des péricarpes des grenades des variétés Mollar de Elche et Valenciana.	231
Figure 4.13 : Relations entre les teneurs en composés ciblés des péricarpes des grenades Mollar de Elche au cours de leur conservation.	234
Figure 4.14 : Effet de la durée de conservation des grenades Mollar de Elche sur les teneurs en polyphénols de leurs péricarpes.	235
Figure 4.15 : Effet de l'humidité de conservation des grenades Mollar de Elche sur les teneurs en polyphénols de leurs péricarpes.	238
Figure 4.16 : Effet de la température de conservation des grenades Mollar de Elche sur les teneurs en polyphénols de leurs péricarpes.	239
Figure 4.17 : Effet de l'immersion avant la conservation des grenades Mollar de Elche sur les teneurs en polyphénols de leurs péricarpes.	241
Figure 4.18 : Relations entre les teneurs en composés ciblés des péricarpes des grenades Valenciana au cours de leur conservation.	245
Figure 4.19 : Effet de la durée de conservation des grenades Valenciana sur les teneurs en polyphénols de leurs péricarpes.	246
Figure 4.20 : Effet de l'humidité de conservation des grenades Valenciana sur les teneurs en polyphénols de leurs péricarpes.	248
Figure 4.21 : Effet de la température de conservation des grenades Valenciana sur les teneurs en polyphénols de leurs péricarpes.	249
Figure 4.22 : Effet de l'immersion avant la conservation des grenades Valenciana sur les teneurs en polyphénols de leurs péricarpes.	251
Figure 4.23 : Relations entre le rendement en huile et les teneurs relatives en acides gras des co-produits de pressage des grenades.	264
Figure 4.24 : Comparaison du rendement en huile et des teneurs en acides gras des co-produits de pressage des graines des grenades des variétés Mollar de Elche et Valenciana.	265

Figure 4.25 : Effet de la durée de conservation des grenades sur le rendement en huile et les teneurs en acides gras des co-produits de pressage des graines.....	266
Figure 4.26 : Effet de l'humidité de conservation des grenades sur le rendement en huile et les teneurs en acides gras des co-produits de pressage des graines.....	268
Figure 4.27 : Effet de la température de conservation des grenades sur le rendement en huile et les teneurs en acides gras des co-produits de pressage des graines.....	269
Figure 4.28 : Effet de l'immersion des grenades avant leur conservation sur le rendement en huile et les teneurs en acides gras des co-produits de pressage des graines.....	271
Figure 5.1: Pericarp extract yields and phenolic contents from 0 to 8 weeks of spontaneous fermentation. ....	285
Figure 5.2: Principal component analysis biplot of pericarp sample scores and loadings (yield and phytochemical contents) on the first and second principal component (PC1 and PC2) plane. ....	287
Figure 5.3: Seed press residue oil yield and major fatty acid relative contents over 8 weeks of spontaneous fermentation.....	291
Figure 5.4: Principal component analysis biplot of press seed residue sample scores and loadings (oil yield and fatty acid relative contents) along the PC1 and PC2 plane.....	293
Figure 5.5: Correlations between phenolic contents from pomegranate pericarp over spontaneous fermentation.....	297
Figure 5.6 : Évolution des teneurs en polyphénols des péricarpes de grenade entre les méthodes de déshydratation. ....	301
Figure 5.7 : Effet de la température de séchage en étuve ventilée des péricarpes de grenade obtenus industriellement sur leur composition chimique et comparaison à la lyophilisation. ....	303
Figure 5.8 : Évolution des teneurs en huile (A) et en acides gras (B,C) des co-produits de pressage des graines de grenade au cours de leur séchage.....	307
Figure 5.9 : Effet de la température de séchage en étuve ventilée des co-produits de pressage des graines de grenade sur leur composition chimique et comparaison à la lyophilisation. ....	309
Figure 5.10 : Durée minimale de séchage en étuve ventilée des co-produits de pressage des graines pour leur conservation longue durée. ....	311
Figure 5.11 : Évolution des teneurs en huile (A) et acides gras (B,C) des co-produits de pressage des graines de grenade après séchage en étuve ventilée, campagne 2021.....	313
Figure 5.12 : Durée minimale de séchage en sécheur à tapis en continu des co-produits de pressage des graines pour leur conservation longue durée. ....	314
Figure 5.13 : Évolution des teneurs en huile (A) et acides gras (B,C) des co-produits de pressage des graines de grenade après séchage en sécheur à tapis en continu, campagne 2021.....	318

Figure 6.1 : Proposition de voies de valorisations liées aux conditions d'accumulation de composés à valeur ajoutée dans les co-produits stabilisés de grenades. ....	329
Figure A1 : Relation entre la teneur en punicalagine des péricarpes de grenade non traitées (B) et traitées (C) et les températures ambiantes moyennes mesurées sur les parcelles (A). ....	336
Figure A2 : Relation entre la teneur en punicalagine des péricarpes de grenade non traitées (B) et traitées (C) et les températures ambiantes maximales mesurées sur les parcelles (A). ....	337
Figure A3 : Évolutions des températures minimales (A), moyennes (B) et maximales (C) pendant le développement des grenades. ....	339
Figure A4 : Relation entre les teneurs en acide punique des co-produits de pressage des graines de grenade et les températures ambiantes minimale (A), moyenne (B) et maximale (C) mesurées sur les parcelles. ....	340
Figure A5 : Relation entre les teneurs en acide $\beta$ -éléostéarique des co-produits de pressage des graines de grenade et les températures ambiantes minimale (A), moyenne (B) et maximale (C) mesurées sur les parcelles.. ....	341

## Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Nutriments et substances dont l'apport a été évalué sur l'éclatement des grenades. ....	32
Tableau 1.2 : Impact du conditionnement des co-produits de grenade sur leur composition chimique.....	70
Tableau 2.1 : Caractéristiques des variétés de grenade étudiées.....	96
Tableau 2.2 : Extrait du compte rendu d'expérimentations 2019, programme GIMMS, SudExpé Site de Marsillargues (29/10/2019), X. Crété et C. Corblin. ....	98
Tableau 2.3 : Co-produits générés par les grenades des variétés Mollar de Elche (M) et Provence (P) cultivées sur 6 parcelles différentes, avec (T) ou sans (NT) traitement contre l'éclatement. ....	100
Tableau 2.4 : Conditions de conservation des grenades.....	102
Tableau 2.5 : Codage des co-produits générés par les différentes conditions de conservations des grenades des variétés Mollar de Elche (M) et Valenciana (V). ....	103
Tableau 2.6 : Lots de co-produits générés par les méthodes de conditionnement (lyophilisation, séchage, fermentation spontanée). ....	107
Tableau 3.1 : Comparaison de la couleur des grenades Mollar de Elche avec celles de la littérature. ....	124
Tableau 3.2 : Effet du traitement foliaire sur l'éclatement des grenades Provence et Mollar de Elche. ....	125
Tableau 3.3 : Caractérisation chimique des péricarpes des grenades.....	131
Tableau 3.4 : Caractérisation chimique des co-produits de pressage des grenades. ....	135
Tableau 3.5 : Variables et facteurs interprétables de l'analyse en composante principale, par composantes sélectionnées PC1, PC2 et PC3. ....	137
Tableau 3.6 : Données bibliographiques des effets de la variété et de la région de culture des grenades sur la teneur en polyphénols des péricarpes.....	146
Tableau 3.7 : Effet de la variété de grenade sur la teneur en punicalagine des péricarpes par localisation et traitement. ....	148
Tableau 3.8 : Effet de la localisation des parcelles de grenades sur la teneur en punicalagine des péricarpes par variété et traitement. ....	151
Tableau 3.9 : Effet du traitement foliaire sur la teneur en punicalagine des péricarpes par variété et traitement.....	157
Tableau 3.10 : Variables et facteurs interprétables de l'analyse en composante principale de la composition des co-produits de pressage des graines de grenades. ....	163
Tableau 3.11 : Résumé des effets des conditions de culture sur la teneur en acide punique des co-produits de pressage.....	171
Tableau 3.12 : Résumé des effets des conditions de culture sur la teneur en acide $\beta$ -éléostérique des co-produits de pressage.....	171

Tableau 4.1 : Effet de l'humidité sur la masse des grenades. ....	204
Tableau 4.2 : Effet de la température sur la masse des grenades. ....	205
Tableau 4.3 : Effet de l'immersion des grenades sur la masse des grenades.....	206
Tableau 4.4 : Taux d'altérations d'origine physiologique ou microbienne (%) à la surface des grenades des variétés Mollar de Elche ou Valenciana au cours de leur conservation jusqu'à 8 semaines. ....	218
Tableau 4.5 : Taux d'altérations par craquelure (%) de la surface des grenades des variétés Mollar de Elche ou Valenciana au cours de leur conservation jusqu'à 8 semaines.....	220
Tableau 4.6 : Taux d'altérations par éclatement (%) de la surface des grenades des variétés Mollar de Elche ou Valenciana au cours de leur conservation jusqu'à 8 semaines.....	222
Tableau 4.7 : Composition des péricarpes de grenades Mollar de Elche et Valenciana avant leur conservation (n=10 fruits). ....	224
Tableau 4.8 : Composition des péricarpes au cours de la conservation des grenades. ....	227
Tableau 4.9 : Variables (composition chimique) et facteurs interprétables (variété, condition et durée de conservation) de l'analyse en composante principale des échantillons de péricarpes des grenades Mollar de Elche et Valenciana conservées. ....	229
Tableau 4.10 : Variables (composition chimique) et facteurs interprétables (condition et durée de conservation) de l'analyse en composante principale des échantillons de péricarpes des grenades Mollar de Elche. ....	232
Tableau 4.11 : Relation entre la composition moléculaire des péricarpes et la masse, la couleur et l'aspect des grenades Mollar de Elche au cours de leur conservation (n=12 à 0, 4 et 8 semaines). ....	242
Tableau 4.12 : Variables (composition chimique) et facteurs interprétables (condition et durée de conservation) de l'analyse en composante principale des échantillons de péricarpes des grenades Mollar de Elche. ....	244
Tableau 4.13 : Relation entre la composition moléculaire des péricarpes et la masse, la couleur et l'aspect des grenades Valenciana au cours de leur conservation (n=12 à 0, 4 et 8 semaines). ....	253
Tableau 4.14 : Effets principaux des paramètres de conservation des grenades Mollar de Elche et Valenciana sur la composition de leurs péricarpes. ....	256
Tableau 4.15 : Composition des co-produits de pressage des grenades Mollar de Elche et Valenciana avant leur conservation (n=10 fruits). ....	257
Tableau 4.16 : Composition lipidique des co-produits de pressage des graines au cours de la conservation des grenades.....	260
Tableau 4.17 : Variables (composition chimique) et facteurs interprétables (variété, condition et durée de conservation) de l'analyse en composante principale des échantillons de péricarpes des grenades Mollar de Elche et Valenciana. ....	262
Tableau 4.18 : Relation entre la composition moléculaire des péricarpes et la masse, la couleur et l'aspect des grenades Mollar de Elche au cours de leur conservation (n=12 à 0, 4 et 8 semaines). ....	273
Tableau 4.19 : Relation entre la composition moléculaire des péricarpes et la masse, la couleur et l'aspect des grenades Valenciana au cours de leur conservation (n=12 à 0, 4 et 8 semaines). ....	274

Table 5.1: Variable (pomegranate pericarp yield and phytochemical contents) loadings on the first and second principal component (PC1 and PC2) plane.....	288
Table 5.2: Variable (pomegranate seed press residue oil yield and fatty acid relative contents) loading on the first and second principal components (PC1 and PC2) plane.....	294
Table 5.3: Spontaneous fermentation duration effects on pomegranate pericarp components. ....	297
Table 5.4: Spontaneous fermentation duration effects on pomegranate seed press residue components. ....	298
Tableau 5.5 : Composition en polyphénols des péricarpes de grenade après leur déshydratation. ....	299
Tableau 5.6 : Interprétabilité des composés analysés (variables) et du mode de déshydratation (facteur étudié) des péricarpes de grenade.....	302
Tableau 5.7 : Composition des co-produits de pressage des graines de grenade après leur déshydratation. ....	306
Tableau 5.8 : Interprétabilité des composés analysés (variables) et du mode de déshydratation (facteur étudié) des co-produits de pressage des graines de grenade.....	308
Tableau 5.9 : Composition des co-produits de pressage des graines de grenade après séchage en étuve ventilée, campagne 2021. ....	312
Tableau 5.10 : Composition des co-produits de pressage des graines de grenade après séchage en sécheur à tapis en continu, campagne 2021.....	316
Tableau 5.11 : Effet du type d'appareil utilisé et des paramètres de séchage sur la composition en lipides des co-produits de pressage des graines (campagne 2021).....	319
Tableau 6.1 : Récapitulatif de la variation des principaux composants des co-produits de transformation des grenades.....	327
Tableau A1 : Etalonnages pour le dosage colorimétrique de Folin-Ciocalteu.....	332
Tableau A2 : Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) de l'acide ellagique, la punicalagine et la punicaline de six étalonnages.....	333
Tableau A3 : Répétabilité d'injection en chromatographie gazeuse pour deux échantillons 1 et 2, et trois injections. ....	334



## Liste des abréviations

- ABTS : acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
- ACP ou PCA : Analyse en composantes principales ou « *Principal Component Analysis* »
- ADF : fibres insolubles dans les détergents acides
- AGPI ou PUFA : acide gras polyinsaturé ou *polyunsaturated fatty acid*
- AGPC : acide gras polyinsaturé conjugué
- ANOVA ou Anova : Analyse de la variance
- ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
- aw : activité de l'eau
- BHT : hydroxytoluène butylé
- CAT : catalase
- CIE : Commission Internationale de l'Eclairage
- CLA : acide linoléique conjugué
- CLHP : chromatographie liquide haute performance
- CLnA : acide linoléique conjugué
- CPG : chromatographie en phase gazeuse
- cv. : cultivar
- DAD : détection à barrette de diode
- DIC : Détente Instantanée Contrôlée
- DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
- eae : équivalent d'acide ellagique
- eag : équivalent d'acide gallique
- eat : équivalent d'acide tannique
- ec : équivalent de catéchine
- ec-3-g : équivalent de cyanidine-3-glucoside
- EDTA : éthylènediaminetétraacétique
- FAME : esters méthyliques d'acide gras
- FAO : Organisation pour l'alimentation et l'agriculture, "Food and Agriculture Organization"
- FEADER : fonds européen agricole pour le développement rural
- FEDER : fonds européen de développement régional
- FID : détecteur à ionisation de flamme
- g/g : gramme par gramme
- GIEC ou *IPCC* : Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Évolution du Climat ou *Intergovernmental Panel on Climate Change*
- GPX : glutathione peroxydase
- HHDP : hexahydroxydiphenoyl
- HPE : extraction à haute pression



IC50 : concentration inhibitrice médiane  
IDF : fibres insolubles  
LCA : Laboratoire de Chimie Agro-industrielle  
LOD : Limite de détection  
LOQ : Limite de quantification  
MAE : extraction assistée par micro-ondes  
MEB : microscopie électronique à balayage  
MeOH : méthanol  
MIC : concentration inhibitrice minimale  
mh : masse humide  
MR : ratio d'humidité  
ms : masse sèche  
NDF : fibres insolubles dans les détergents neutres  
PACA : Provence-Alpes-Côte d'Azur  
PC : composante principale, « *principal component* »  
pH : potentiel hydrogène  
POD : peroxydase  
PPAR $\gamma$  : Récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxysomes  
PPO : polyphénol oxydase  
PTFE : polytétrafluoroéthylène  
RCP : scénarios d'évolution des concentrations de gaz à effet de serre ou « *Representative Concentration Pathway* »  
rdt : rendement  
RH : humidité relative  
ROS : espèces réactives de l'oxygène  
SDF : fibres solubles  
SFE : extraction par fluide supercritique  
SOD : superoxyde dismutase  
TBME : méthyl *tert*-butyl éther  
TMSH : hydroxyde de triméthylsulfonium  
tpc : teneur en polyphénols totaux  
UAE : extraction assistée par ultrasons  
UE : Union Européenne  
UMR : Unité Mixte de Recherche  
UV : ultraviolet  
v/v : volume à volume  
Vis : visible  
VMD : séchage sous vide par micro-onde

## INTRODUCTION

---

Le grenadier est implanté dans le sud de la France depuis de nombreuses années ce qui a notamment conduit à l'émergence d'une variété locale nommée "Provence". Pourtant, ce n'est qu'à partir des années 2010 que des vergers de grenadiers ont commencé à se développer à plus grande échelle sur le territoire. En effet, des agriculteurs locaux faisant face à un besoin de diversification ont décidé de se tourner vers le grenadier pour des raisons pratiques et économiques, liées à une simplicité d'entretien et une période de récolte en décalage des autres cultures. Cette démarche est par ailleurs soutenue par les pouvoirs publics, car concorde avec les enjeux de maintien et d'amélioration de la biodiversité.

Afin de répondre à une demande croissante et non saisonnière ainsi qu'à la concurrence du Marché, les producteurs de grenade ont aussi décidé de transformer leur production en jus de grenade. Un projet européen FEADER portant sur les systèmes de culture et de transformation des grenades françaises a été conduit à partir de 2017 pour, entre autres, améliorer les qualités organoleptiques de leur jus. Néanmoins, lors de la transformation des grenades, 50 à 70 % du fruit sont écartés (enveloppe et co-produit de pressage), générant des volumes importants de co-produits actuellement épandus ou compostés dans la région. Cette valorisation de premier niveau répond à une partie des enjeux environnementaux de l'agriculture durable. Elle permet le maintien de la matière organique dans les sols et donc leur fertilité. D'autre part, elle implique plusieurs acteurs sur le territoire et par conséquent participe à la réduction des émissions de gaz à effet de serre et de l'emploi d'énergies fossiles.

Dans un contexte de développement de l'économie circulaire et considérant les qualités du fruit, les acteurs de la filière émergente ont entrepris une réflexion sur des voies alternatives et complémentaires de valorisation des co-produits de grenade. Les producteurs de grenade ont alors fait appel à SiBio!, société de transformation des fruits et légumes bio en Occitanie, et aux membres du Laboratoire de Chimie Agro-industrielle UMR 1010 INRAe-INP (LCA), expert dans la caractérisation et la transformation de la biomasse à travers des procédés verts, et de l'équipe Organisations, DYnamiques des Connaissances et des innovations dans les tErritoires et les filièrEs (ODYCEE) UMR AGroécologie, Innovations et TeRritoires (AGIR), spécialisée dans l'étude des acteurs des secteurs de l'agriculture et de l'agroalimentaire et leurs relations. De ce partenariat a émergé le projet GIMMS « Caractérisation physico-chimique et valorisation socio-économique des co-produits de la grenade occitane » débutant en 2019, financé par la région Occitanie et l'Union Européenne à travers le financement FEDER.

Le projet GIMMS a pour but de décrire et de proposer de nouvelles voies de valorisation des co-produits de grenades, avec la construction des *scenarii* économiques et marketing de valorisation des co-produits de la Grenade occitane (équipe ODYCEE) ; et des études de caractérisation physico-chimique des co-produits de grenades françaises, particulièrement des molécules d'intérêt à valeur ajoutée, reliées aux effets des procédés de culture, de conservation et de conditionnement. Ce dernier volet a donné lieu aux travaux de thèse présentés dans ce manuscrit.

Les connaissances actuelles sur les composés à valeur ajoutée de la grenade et plus spécifiquement des co-produits de grenade sont décrits dans le premier chapitre. Ces informations permettent, entre autres, de mettre en exergue les éléments clés pouvant être à l'origine de variations des teneurs en composés ciblés, depuis la culture des grenades jusqu'à l'extraction des molécules à valeur ajoutée. Ce chapitre expose aussi la problématique générale du projet de thèse et les verrous scientifiques à lever.

Les principales expérimentations mises en œuvre pour répondre à cette problématique et aux objectifs des travaux de thèse sont détaillées dans le chapitre 2.

Ensuite, les résultats des travaux de thèse sont présentés dans trois chapitres distincts, correspondant à l'étude de l'accumulation ou la dégradation des molécules à valeur ajoutée des co-produits de grenade à trois étapes : la culture des grenadiers, la conservation des grenades et le conditionnement des co-produits.

Le troisième chapitre présente par conséquent l'effet des conditions de culture sur la composition moléculaire des co-produits de grenade, en considérant l'influence de la variété, des conditions pédoclimatiques et d'un traitement foliaire.

Le quatrième chapitre décrit l'effet de douze conditions de conservation sur les composés à valeur ajoutée des co-produits, grâce auxquelles les impacts de la température, l'humidité et l'immersion des fruits avant leur conservation seront définis.

Le cinquième chapitre traite de l'effet du conditionnement des co-produits de transformation sur leur composition chimique, et plus particulièrement de deux procédés sélectionnés pour leur compatibilité avec les structures implantées sur le territoire : le séchage et la fermentation spontanée (ensilage).

Les conclusions concernant l'effet des conditions de culture et de conservation des grenades, ainsi que l'impact du conditionnement des co-produits de transformation, sur les teneurs en composés ciblés à valeur ajoutée sont ensuite exposées. Ces éléments ont pour ambition d'aider les acteurs de la filière grenade en émergence dans leurs pratiques actuelles, et d'apporter les connaissances suffisantes pour adapter ou développer de nouveaux procédés pour traiter la grenade et ses co-produits "du champ à l'ingrédient naturel".

# **1. ÉTAT DE L'ART**



## 1.1. Le Grenadier

Le grenadier *Punica granatum* L. est un arbre originaire d'Asie centrale dont la culture s'est étendue à de nombreuses régions ayant une saison chaude et peu de précipitations [1]. Du fait de sa propagation autour du monde, de nombreuses variétés ont émergé et aujourd'hui plus de 5 000 génotypes (parfois en double) ont été répertoriés dans des banques de gènes, pour plus de 500 variétés décrites [2]. Les grenadiers présentent une certaine résistance à la sécheresse selon les variétés [3]. Les territoires sujets à des périodes de sécheresse vont avoir tendance à s'accroître dans les prochaines années en raison du réchauffement climatique, comme le montrent les projections du Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Évolution du Climat (GIEC) (figure 1.1) [4]. Dans ce contexte de réchauffement climatique mondial, la culture du grenadier pourrait montrer une certaine résilience de même que d'autres arbres fruitiers tels que le jujubier, le pistachier et le néflier du Japon [5] dans les régions semi-arides du bassin Méditerranéen.

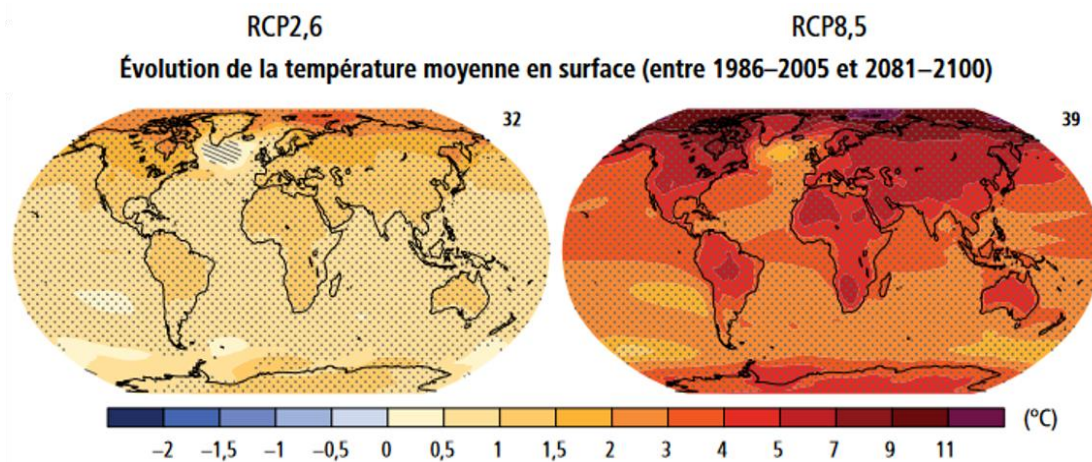


Figure 1.1 : « Évolution de la température moyenne en surface [...] fondée sur des projections multimodèles moyennes pour la période 2081–2100 par rapport à la période 1986–2005, selon les scénarios d'évolution des concentrations de gaz à effet de serre RCP (Representative Concentration Pathway) RCP2,6 (à gauche) et RCP8,5 (à droite). Le nombre de modèles utilisés pour calculer la moyenne multimodèle figure dans l'angle supérieur droit de chaque image. Les pointillés signalent les régions dans lesquelles le changement projeté est grand par rapport à la variabilité naturelle interne et dans lesquelles 90 % au moins des modèles s'accordent sur le signe du changement. Les hachures signalent les régions dans lesquelles le changement projeté est inférieur à un écart type de la variabilité naturelle interne. » Figure et légende extraites de *Changements climatiques 2014 : Rapport de synthèse. Contribution des Groupes de travail I, II et III au cinquième Rapport d'évaluation du Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat* [4], page 12.

Actuellement, le grenadier est cultivé sur tous les continents du monde (figure 1.2), bien que les principaux pays producteurs soient l'Inde, l'Iran, la Turquie, les États-Unis (Californie), l'Égypte, le Maroc, Israël, le Pérou, le Chili et l'Espagne [6–8]. La culture de la grenade est en pleine expansion avec des volumes croissant depuis les dix dernières années dans certains pays. D'après leurs données gouvernementales, la production de la Turquie a augmenté de 45 % entre 2015 et 2021, celle du Pérou de 360 % pendant la même période, celle du Mexique de 84 % entre 2015 et 2020,

celle de l'Inde de 41 % entre 2015 et 2019, et enfin celle de l'Espagne a augmenté de 28 % entre 2015 et 2019 [9–13].

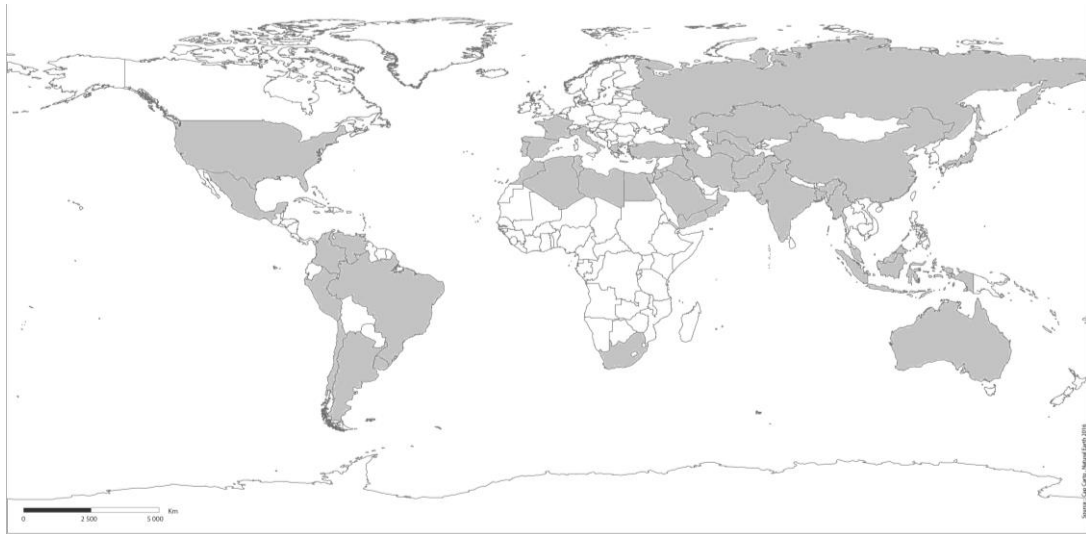


Figure 1.2 : Culture de la grenade dans le monde. Les pays dans lesquels des grenadiers ont été répertoriés sont indiqués en gris. Reproduit de Lamotte et al. [14].

En France, la culture du grenadier est très récente (années 2010) et aussi en pleine expansion [15]. Les volumes produits sont difficiles à évaluer car la fructification ne débute qu'après la troisième ou quatrième année [15], et certains vergers n'ont pas encore atteint ce stade. La culture du grenadier a fait suite à un besoin de diversification des agriculteurs des régions Occitanie et Provence-Alpes-Côte d'Azur (PACA) faisant face à plusieurs problématiques. Tout d'abord, la variabilité des rendements de production induite par le changement climatique engendre une instabilité économique partiellement réductible par l'augmentation du nombre d'espèces cultivées [16]. Ensuite, la volatilité des marchés aux échelles locale, nationale mais aussi européenne a conduit à des recommandations de réduction de la production de certains fruits et légumes. Par exemple, la restructuration et la reconversion des vignobles sont fortement encouragées dans le secteur vitivinicole par le règlement (UE) n°1308/2013 [17], amenant à l'arrachage de parcelles de vignes. La diversification des cultures a aussi une dimension écologique par l'augmentation de la biodiversité sur les parcelles, et fait notamment partie des propositions d'adaptation au changement climatique du GIEC (IPCC) [18]. Le grenadier, adapté au climat Méditerranéen, a donc été sélectionné par les agriculteurs souhaitant se diversifier. Les variétés cultivées en France sont principalement des cultivars espagnols (Mollar de Elche, Valenciana) du fait de leur proximité géographique, mais aussi des cultivars très commercialisés comme Wonderful (États-Unis) ou Acco (Israël), et un cultivar endémique du sud de la France, Provence [15]. Une collection variétale et des essais en champ visant à apporter des connaissances de terrain sur l'adaptation des variétés sur le territoire ont été mis en place par la plateforme expérimentale SudExpé, Sica Centrex 66 et la Chambre Régionale d'Agriculture d'Occitanie depuis 2017. Ces essais ont mis en lumière plusieurs limites à la culture du grenadier dans le sud de la France.

Tout d'abord, les épisodes de gel se produisant au début du printemps, c'est-à-dire pendant la période de nouaison des grenadiers, impactent négativement les récoltes et

retardent la fructification des jeunes arbres. Ces phénomènes sont connus depuis de nombreuses années en arboriculture [19] et sont par ailleurs au cœur des défis d'adaptation au changement climatique à relever pour la sécurité alimentaire [20]. Plus particulièrement pour le grenadier, la plupart des variétés cultivées à travers le monde sont sensibles aux températures inférieures à  $-12\text{ °C}$  [1] et affectées significativement par les gelées tardives [21]. De nombreuses recherches sont menées pour améliorer les systèmes de culture du grenadier vis-à-vis de ces vagues de froid. Par exemple, la comparaison de la résistance au gel de plusieurs variétés a montré une hétérogénéité selon leur origine [22–24]. Ces études ont été couplées avec des investigations sur les processus biologiques impliqués dans la gestion du stress thermique. Elles ont montré une importance du métabolisme, génotype, et des facteurs environnementaux dans la réponse des grenadiers à ces épisodes [23–25]. Les pertes engendrées par les gelées tardives sont liées au déclin des arbres, principalement les arbustes immatures, ou des premiers bourgeons. Dans le sud de la France, le climat pendant la période de fructification (printemps-été) a des spécificités par rapport à d'autres régions soumises au climat méditerranéen [26,27] et les seconds bourgeons n'ont pas les conditions optimales de développement ce qui entraîne ces pertes considérables et parfois des récoltes de fruits immatures. La sélection variétale des grenadiers cultivés en France doit donc inclure la dimension « sensibilité au gel » afin de se pérenniser.

Ensuite, le rendement de production des grenades françaises est diminué fortement par des pertes liées à l'éclatement des fruits. Dans certains cas, des baisses de plus d'un quart de la production sont observées [28]. L'éclatement ainsi que les brûlures liées au soleil (« *sunburn* ») sont étudiés depuis plusieurs années à travers le monde [29] puisque ces deux altérations de surface sont majoritairement à l'origine des pertes post-récolte [30,31]. Les facteurs environnementaux mais aussi les systèmes de culture mis en place sembleraient à l'origine de ce phénomène, ou pourraient le limiter.

Les brûlures liées au soleil résultent d'une exposition prolongée au soleil [29]. Elles apparaissent sous la forme de taches brunes, petites zones à la surface des fruits. Elles touchent les exploitations de grenadiers de climats désertiques, c'est pourquoi ces altérations ne sont pas la principale cause des pertes de production en France.

En revanche, l'éclatement des fruits est un phénomène multifactoriel, qui dépend notamment de la variété de grenade considérée [30]. Bien qu'étant un phénomène physiologique normal pour le fruit arrivé à maturité, les craquelures ou éclatements des fruits sur l'arbre apparaissent aussi pendant le développement des grenades [29], ce qui conduit à la diminution des rendements de production. Les facteurs à l'origine de ces altérations pendant le développement des grenades ont été recensés par Pareek et al. [29] et plus récemment par Singh et al. [30]. Les principaux sont l'irrigation, les conditions environnementales et les déficits en nutriments. Les systèmes de culture du grenadier peuvent donc être adaptés pour limiter l'éclatement des fruits par l'irrigation ou l'apport de nutriments.

L'effet de certains nutriments a été évalué sur l'éclatement des grenades, et ils sont listés sur le tableau 1.1. Concernant les vergers du sud de la France, leur conduite en agriculture biologique pour la majorité [15] induit la nécessité de sélectionner des nutriments compatibles avec le cahier des charges du label, conformément à l'Annexe II du règlement (UE, Euratom) n°2021/1163 [32]. Parmi les nutriments proposés pour le grenadier, le bore, le calcium et le zinc sont compatibles avec la



conduite en agriculture biologique (tableau 1.1) et ont montré leur intérêt dans la limitation de l'éclatement des fruits. Toutefois, l'apport foliaire de bore et du zinc semble dans certains cas ne pas avoir d'effet bénéfique sur l'éclatement des fruits. D'autres facteurs environnementaux sont donc à prendre en compte en ce qui concerne leur emploi sur les grenadiers français.

Tableau 1.1 : Nutriments et substances dont l'apport a été évalué sur l'éclatement des grenades.

Nom	Abréviation	Effet sur l'éclatement ou les craquelures	Référence	Compatibilité Agriculture Biologique
Chlorure de calcium (CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O)	Ca	diminution	[33]	X
		diminution	[34]	X
		diminution	[35] dans [30]	X
Nitrate de calcium (CaNO <sub>3</sub> )	Ca	diminution	[31]	
		diminution	[36]	
Borate de calcium (CaB <sub>2</sub> O <sub>6</sub> )		diminution	[36]	
Nitrate d'ammonium (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> )	N	diminution	[33]	
Sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> )	Mg	diminution	[37] dans [29]	X
Nitrate de potassium (KNO <sub>3</sub> )	K	diminution	[37] dans [29]	X
		diminution	[31]	X
Sulfate de zinc (ZnSO <sub>4</sub> )	Zn	diminution	[38] dans [29]	X
		diminution	[39] dans [30]	X
Nano chélate de zinc	Zn	aucun	[40]	
Chélate de zinc avec de l'EDTA (Zn-EDTA)		diminution	[36]	X
Nano chélate de bore		aucun	[40]	
Acide borique (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	B	diminution	[37] et [41] dans [29]	X
		diminution	[34]	X
		pas clair	[42]	X
Borate de sodium hydraté (Borax, B <sub>4</sub> H <sub>20</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>17</sub> )		diminution	[39] dans [30]	
Silicate d'aluminium (kaolin, Al <sub>2</sub> Si <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (OH) <sub>4</sub> )	Al	diminution	[31]	X
		diminution	[35] et [39] dans [30]	X
Pacloutrazol		diminution	[38] et [43] dans [29]	
Forchlorfuron		diminution	[44] dans [29]	
Acide gibérellique	GA3	diminution	[42] dans [29]	
		diminution	[34]	
		diminution	[35] dans [30]	

## 1.2. La Grenade

La grenade est une baie de couleur rouge, rose à violet avec des nuances de jaune ou vert selon les variétés [45]. Une enveloppe (péricarpe), composée de l'exocarpe et du mésocarpe blanc-jaune spongieux, entoure les loges des graines comestibles contenant notamment la partie juteuse, l'arille, entourant une partie interne (figure 1.3) [46].

L'anatomie de la grenade ne fait pas consensus dans la littérature car la graine de grenade (« *pomegranate seed* ») est parfois appelée « arille » (« *aril* »), la partie interne de la graine « pépin » (« *seed* »). Par ailleurs, l'enveloppe (« *rind* ») ou peau (« *peel* ») peut faire référence uniquement à l'exocarpe (« *exocarp* ») ou au péricarpe (« *pericarp* ») selon les auteurs.

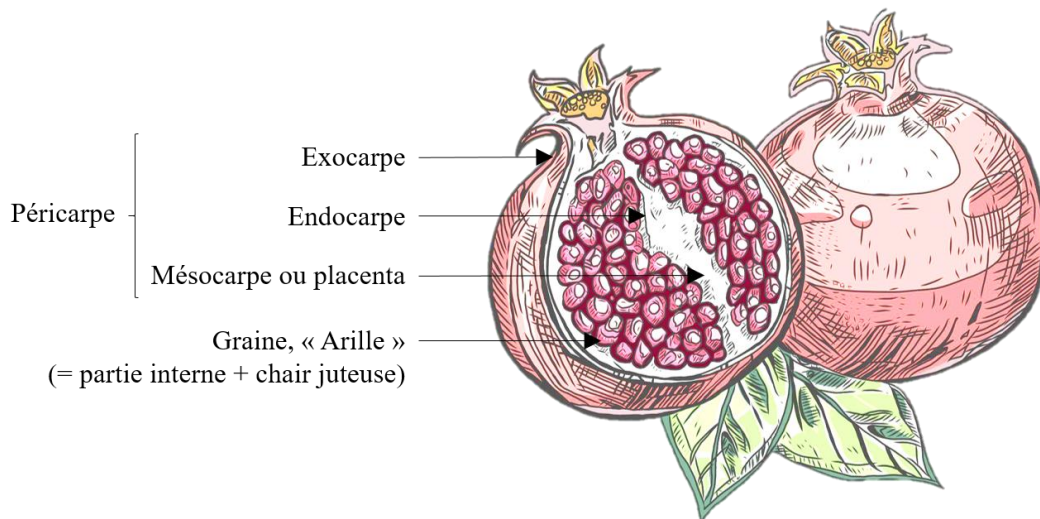


Figure 1.3 : Anatomie de la grenade.

L'intérêt pour la consommation de grenade est lié d'une part à ses qualités organoleptiques [47], et d'autre part à ses propriétés nutritionnelles avancées plus récemment [1]. Les propriétés organoleptiques et nutritionnelles de la grenade sont liées aux métabolites et minéraux présents dans la partie comestible du fruit, les graines, mais aussi dans les jus obtenus par pressage du fruit entier ou seulement des graines [48–50]. Les principaux métabolites bioactifs appartiennent aux classes des glucides, des acides organiques, des polyphénols, des vitamines et des acides gras [48–50]. Leurs propriétés biologiques ont été regroupées par Viudamartos et al. [48], Sreekumar et al. [51], et plus récemment par Ranjha et al. [52] et incluent la capacité antioxydante, anti-inflammatoire, la protection du système cardiovasculaire, la prévention et le traitement de l'obésité.

La grenade peut être commercialisée entière, égrenée ou sous la forme de produits transformés comme le jus [53]. Dans certains pays producteurs comme la France, la combinaison de la saisonnalité de la récolte et d'une demande croissante en aliments avec une valeur nutritionnelle élevée favorise les procédés de transformation permettant d'accéder aux produits toute l'année [54]. En France plus particulièrement, la compétitivité du marché européen des fruits et légumes frais [6] a aussi largement contribué à privilégier la transformation de la production de grenades.

Dans ce sens, et au vu des structures de transformation des fruits et légumes implantées sur le territoire, la production de grenade française est principalement transformée en jus. En s'appuyant sur les procédés développés dans les domaines oléicole et viticole pour améliorer la qualité des produits, les jus de grenade résultent du pressage de plusieurs variétés de grenade cultivées localement. Cet assemblage a l'avantage de lutter contre l'effet millésime, c'est-à-dire des variations des propriétés organoleptiques du jus entre les années, grâce aux caractéristiques gustatives propres

à chaque variété [55]. De plus, il pourrait rendre le jus plus stable au cours de la conservation, et donc préserver ses qualités nutritionnelles [56]. En revanche, il nécessite des pasteurisations successives, en raison des maturités variables des variétés de grenades engendrant des périodes de récolte différentes [57]. Ces traitements thermiques pourraient altérer la qualité nutritionnelle des jus, par exemple en dégradant des composés actifs comme les polyphénols [58].

Lorsque les grenades sont transformées en graines prêtes à l'emploi ou en jus, plusieurs types de co-produits sont générés (figure 1.4). Pour la commercialisation des graines entières, les péricarpes sont séparés des graines et constituent le seul co-produit généré. Pour la fabrication du jus, les grenades peuvent être pressées entières ou après séparation des graines.

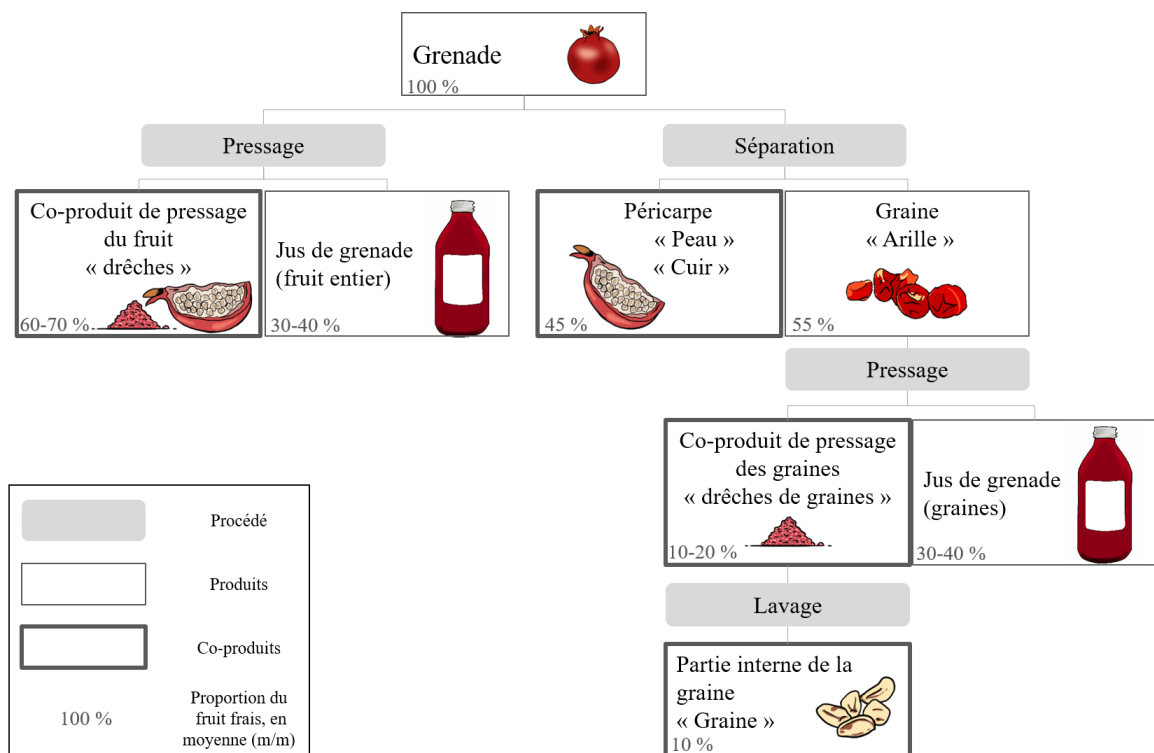


Figure 1.4 : Co-produits générés par les procédés de transformation des grenades. Reproduit de Lamotte et al. [14].

Dans le premier cas, un seul co-produit est formé : le co-produit de pressage des grenades (drêches). Dans le second cas, deux types de co-produits sont formés : les péricarpes et le co-produit de pressage des graines (drêches de graines). Ces nuances sont importantes car le fait de presser le fruit entier ou seulement les graines entraîne des variations de composition en composés bioactifs du jus, et par conséquent des variations pour les co-produits générés [59–62]. De plus, les jus pressés à partir des graines sembleraient de meilleure qualité gustative que ceux obtenus à partir du fruit [63,64]. Ce phénomène serait expliqué par une plus haute concentration en tannins dans les jus obtenus à partir du fruit entier qui augmentent leur astringence. Ces éléments ainsi que des essais empiriques ont conduit les acteurs de la filière grenade du sud de la France à choisir le pressage des graines uniquement.

Les co-produits de grenade correspondent à plus de la moitié du poids du fruit initial (figure 1.4). Dans un contexte de développement de l'économie circulaire, leur valorisation semble être un enjeu majeur de la filière grenade. La connaissance des biomolécules à identifier est une condition préalable nécessaire à cette démarche. Les composés bioactifs des co-produits de grenade sont présentés dans la partie suivante.

### 1.3. Composés bioactifs des co-produits de grenade

#### 1.3.1. Co-produit de pressage des graines

Le co-produit de pressage des graines comporte la partie interne de la graine de grenade d'aspect ligneux et les membranes résiduelles de l'arille (partie juteuse de la graine) [46]. Les proportions de ces éléments varient selon les méthodes d'extraction du jus et les variétés de grenade [63,65,66]. Les co-produits de pressage des graines sont composés principalement de glucides et lignine dont 45,6 % de fibres diététiques (g/g masse sèche ms), de protéines (12,6 % g/g ms), de lipides (16,3–24,3 % g/g ms) [62,67]. Leur teneur en polyphénols est faible (3–4 ; 14–36 et 74 mg/g eag ms pour les variétés Mollar de Elche, Espagne ; Dente di Cavallo, Italie, et commerciale, Espagne) comparée aux péricarpes de grenades (67–432 mg/g eag ms) [67–69].

Ces teneurs en polyphénols ont tout de même conduit à l'investigation du potentiel d'extraits de co-produits de pressage des graines en tant qu'antioxydant. En effet, Boggia et al. [68] ont montré qu'un extrait de marc de grenade (Dente di Cavallo, Italie) pouvait être employé dans la formulation d'un conservateur alimentaire ou d'un gel cosmétique hydrophile. Ces co-produits ont aussi été incorporés avec succès dans une gélatine de poisson pour l'emballage d'aliments. Le film ainsi formé a montré des propriétés antibactériennes (inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus*), ainsi que des propriétés d'hydrophobicité plus performantes que la gélatine de poisson seule (solubilité divisée par deux, thermostabilité et protection de la lumière augmentées) [67]. En outre, le trempage de tranches de pomme dans une solution contenant l'extrait de co-produits de pressage des graines, ou d'acide ellagique, diminue le brunissement du fruit jusqu'à 70 % (144 heures à 0 °C) par rapport au trempage dans l'eau. Ce même extrait de co-produits de pressage de grenade augmente la capacité antioxydante d'un gel hydrophile de 37 %. L'ajout d'acide gallique seul dans la préparation n'augmente le pouvoir antioxydant que de 13 %, encourageant l'utilisation d'un extrait plutôt que des composés purifiés [68].

Les fibres diététiques présentes dans les co-produits de pressage des graines de grenades sont en plus faible quantité que d'autres résidus de l'industrie agroalimentaire (co-produits de pomme : 51 %, de raisin 75 %) [62]. Les polysaccharides présents sont le xylane, une hémicellulose (43 % des polysaccharides totaux), la cellulose (38 %) et la pectine (11 %) [67] (figure 1.5). La présence de 29 % de fibres insolubles (IDF) et 17 % de fibres solubles (SDF), induit un ratio insoluble/soluble de 1,7 [62] ce qui est plus de trois fois moins que pour d'autres fruits tels que le raisin (5,9–12,7), le citron (5,5–9,9) et l'orange (5,3) [70]. Ces deux types de fibres ont des rôles distincts : les SDF augmentent la viscosité, et réduisent la réponse glycémique et le cholestérol du plasma, alors que les IDF sont poreuses, de faible densité, et améliorent le transit intestinal [71]. Les co-produits de pressage des graines de grenades ont un ratio

équilibré en fibres diététiques, les rendant intéressants pour des applications dans le domaine nutraceutique.

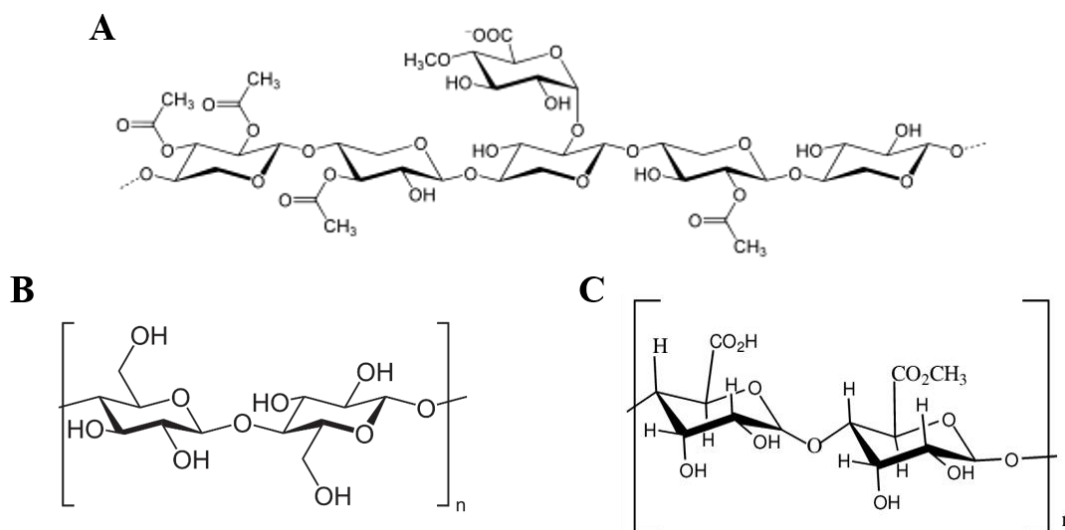


Figure 1.5 : Principaux polysaccharides des co-produits de pressage des graines de grenades : xylane (A), cellulose (B), et pectine (C).

Parmi les lipides présents, les co-produits de pressage des graines (Mollar de Elche, Espagne) contiennent majoritairement de l'acide punique (figure 1.6) à hauteur de 66,7 % de l'ensemble des acides gras identifiés [69]. Les autres sources végétales d'acide punique sont l'huile de graines de *Trichosanthes cucumerina* et de *Trichosanthes kirilowii* Maxim (TK) mais les teneurs sont faibles (< 40 % g/g ms) [72]. D'autres espèces du genre *Trichosanthes* en contiennent aussi dans leurs graines (jusqu'à 52 % de l'huile), de même qu'*Ecballium elaterium* (22 %) et *Momordica balsamina* (50 %) [73–77] dans [78]. Les co-produits de pressage des graines de grenades sont donc la ressource où la teneur en acide punique est la plus élevée. L'acide punique (PuA ou PA), acide trichosanique ou acide 9Z,11E,13Z-octadeca-9,11,13-trienoïque, est un acide gras poly-insaturé et conjugué (C18:3Δ<sup>9</sup>cis,11trans,13cis). Dans la nature, ses isomères principaux sont l'acide α-éléostéarique (18:3Δ<sup>9</sup>cis,11trans,13trans), l'acide calendique (18:3Δ<sup>8</sup>trans,10trans,12cis), l'acide jacarique (18:3Δ<sup>8</sup>cis,10trans,12cis), et l'acide catalpique (18:3Δ<sup>9</sup>trans,11trans,13cis) [79] dans [78]. Les sources commerciales d'acide punique sont toutes biosourcées [78], l'amélioration des rendements d'extraction de cet acide gras représenterait une avancée importante dans le secteur.

La biodisponibilité de l'acide punique et sa métabolisation ont été étudiées *in vivo* sur des mammifères : il serait transformé en acide linoléique conjugué CLA (c9t11), qui est essentiel dans la santé humaine [72]. Au niveau biologique, l'acide punique pourrait prévenir la peroxydation des lipides chez la souris par rapport à un régime sans cet acide gras. Cette activité antioxydante serait liée à l'augmentation de l'activité des enzymes superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), et glutathione peroxidase (GPX) qui apparaît lorsque l'acide punique est combiné à son isomère, l'acide α-éléostéarique chez le rat [72]. Du point de vue thérapeutique, l'acide punique a montré sur des études *in vivo* un rôle dans le traitement de l'obésité, du diabète, d'inflammations, de syndromes métaboliques tels que l'ostéoporose, et les

cancers (sein et prostate) [72]. Les propriétés antidiabétiques de l'acide punique sont encore controversées, mais il ressort tout de même que lorsque le diabète est induit par le régime alimentaire, les symptômes métaboliques sont amoindris chez les rongeurs ayant eu un complément à base de l'acide gras. Des recherches plus approfondies sont donc à mener pour s'assurer de son rôle bénéfique pour cette maladie [72,78].

L'acide punique inhiberait des transporteurs œstrogéniques (SERMs) impliqués dans le cancer du sein et pourrait donc avoir un potentiel dans la chimioprévention du cancer [72]. En combinaison avec d'autres composés bioactifs de la grenade comme l'acide caféique et la lutéoline (3 µg/mL), la prolifération et le développement de cellules du cancer de la prostate sont inhibées. Sur le modèle murin, l'acide punique combiné à l'acide ellagique et la lutéoline diminuent la progression de la tumeur et de métastases [78]. Finalement, l'acide punique a une activité anti-inflammatoire sur des mammifères comme la souris, le rat et le mouton, notamment les inflammations intestinales. Le mécanisme proposé serait lié à l'activation du récepteur PPAR $\gamma$ , régulateur de la réponse inflammatoire et immunitaire chez l'Homme [78]. Du fait de sa structure proche d'autres acides linoléiques conjugués, l'acide punique pourrait, comme l'acide  $\alpha$ -éléostéarique, entrer dans la composition d'huile de séchage industrielle pour le bois, d'encre, d'enrobages et de résines [78,80]. De plus, les acides linoléiques conjugués sont actuellement utilisés dans l'industrie agroalimentaire pour compléter le régime des volailles et améliorer la qualité de la viande [81–83] dans [78].

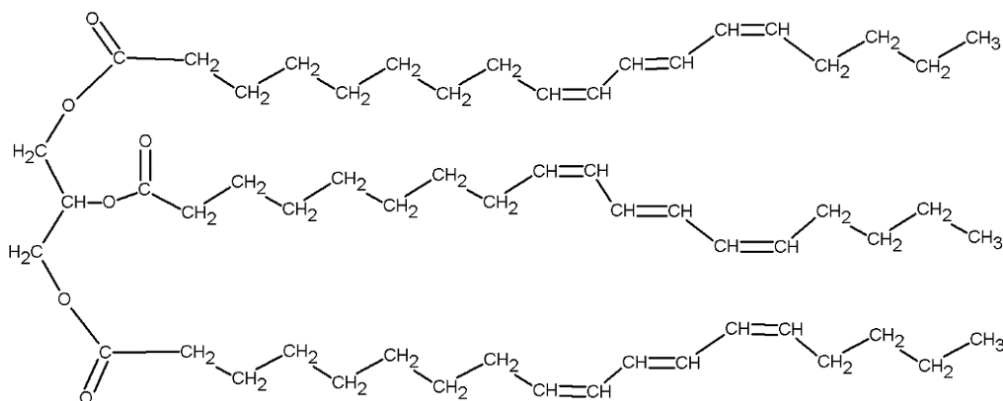


Figure 1.6 : Structure du triglycéride majoritaire de l'huile de grenade comportant trois chaînes d'acide punique (acide 9Z,11E,13Z-octadéca-9,11,13-trièneoïque).

D'après certaines études, les co-produits de pressage des graines de grenades et leurs extraits pourraient être directement utilisés dans les secteurs de l'agroalimentaire et de la cosmétique. Cependant, au vu de la forte teneur relative en acide punique (environ 70 %), et des applications potentielles de ce composé, l'extraction de l'huile des parties internes des graines revêt aussi un intérêt. Dans la majorité des études portant sur cet acide gras issu de grenade, les co-produits de pressage des graines ont été lavés pour obtenir uniquement la partie interne de la graine contenant l'huile.

La partie interne des graines de grenades (variété Torshe Malas, Iran) a une composition différente de l'ensemble des co-produits de pressage, liée à l'absence des résidus de membranes de l'arille : glucides (55 % g/g masse sèche ms), protéines (20 % g/g ms) et lipides (13 % g/g ms) [84]. Les glucides présents

contiennent 19 % (g/g ms) de cellulose, et 21 % (g/g ms) de lignine [85]. La teneur en huile est souvent préférée pour décrire les lipides extractibles de cette partie de la graine, avec un rendement d'extraction allant jusqu'à 60 % (g/g ms) [86]. Cette teneur est variable selon la méthode d'extraction et les variétés de grenade considérées : 18–60 % (g/g ms) dans la variété Wonderful de Grèce [86,87], 22–36 % (g/g ms) dans une variété commerciale de Bosnie-Herzégovine [88] et 25 % (g/g ms) dans une variété commerciale de Chine [89]. La partie interne de la graine de grenade a déjà montré un intérêt pour le secteur agroalimentaire, puisqu'en poudre elle a remplacé avec succès des antioxydants synthétiques en augmentant la stabilité de certains produits alimentaires, comme les boulettes de viande [90].

D'autres recherches ont porté exclusivement sur la caractérisation de l'huile extraite des graines de grenades ou des co-produits de leur pressage. L'huile de grenade (commerciale, Turquie) contient, comme les huiles végétales, des acides gras sous forme triglycérides. Les trois principaux sont composés de chaînes d'acide punicoïque (PuPuPu, 33,0 % g/g de l'huile), deux chaînes d'acide punicoïque et une chaîne d'acide catalpicoïque (PuPuCa, 27,7 % g/g de l'huile), une chaîne d'acide punicoïque et deux chaînes d'acide catalpicoïque (PuCaCa, 10,1 % g/g de l'huile) [91]. Lors de l'analyse conventionnelle d'une huile, les tri-, di- ou mono-glycérides sont hydrolysés et les chaînes d'acides gras sont alors identifiées.

L'étude de Siano et al. [92] a montré que les triglycérides de l'huile de grenade sont aussi sensibles à l'oxydation que d'autres huiles végétales alimentaires. L'acide punicoïque sous forme triglycéride dans l'huile apparaît plus stable que sous sa forme libre, notamment en raison de la stabilité de la molécule engendrée par sa structure, et la présence dans l'huile de composés antioxydants et d'autres lipides. Les mêmes mécanismes de stabilisation ont été décrits pour l'huile de sésame, connue pour sa grande résistance à l'oxydation, et dont les composés antioxydants tels que le sésamol protègent les acides gras [93]. L'huile de grenade (commerciale et Torshe Malas, Iran) contient 8,5 – 10,4 mg/g (ms eag) de polyphénols [84]. Cette teneur est variable car une autre étude a montré une teneur de 0,2 mg/g (eag ms) pour une autre variété (Italie) [92]. Pour comparaison, l'huile d'olive contient entre 0,05 et 1 mg/g de polyphénols avec une moyenne autour de 0,1-0,3 mg/g [93]. La teneur en composés phénoliques de l'huile de grenade justifie donc son intérêt par rapport à d'autres huiles alimentaires. Les autres composés mineurs de l'huile de grenade (Italie) sont le squalène (0,8 mg/g d'huile), des phytostérols (4,2 mg/g d'huile) et des tocophérols (2,2 mg/ g d'huile) [92].

L'huile de grenade a un intérêt dans le domaine des compléments alimentaires en raison de sa teneur en acide punicoïque, dont les propriétés ont été détaillées précédemment. De plus, sa faible teneur en acides gras saturés (< 10 %) par rapport aux poly-insaturés (> 90 %) permet de la qualifier d'huile d'intérêt nutritionnel. En effet, de nombreuses études, et les recommandations nutritionnelles de l'Organisation Mondiale de la Santé [94], sont en accord sur les bénéfices pour la santé de l'ingestion d'acides gras poly-insaturés plutôt qu'insaturés, notamment pour prévenir des maladies cardiovasculaires, diabète, ostéoporose, et cancers [95]. Par ailleurs, il a été démontré que l'huile de grenade peut être encapsulée à l'aide d'une matrice composée de maltodextrine et d'autres additifs naturels (gomme arabique, lait en poudre, protéines de lait) [86,87]. Cette formulation pourrait permettre l'utilisation de l'huile

dans le secteur nutraceutique. De la même manière, l'huile de grenade a été incorporée avec succès avec de la gomme arabique dans des jus et boissons pour modifier leurs propriétés (stabilité, viscosité) [96]. Finalement, l'huile de grenade limiterait la prolifération des lignées cellulaires du cancer de la prostate, lui conférant une possibilité de valorisation dans le domaine thérapeutique [97]. Ces données sont en accord avec les études biologiques et physico-chimiques menées sur les co-produits de pressage des graines de grenade, la partie interne des graines et l'acide punique isolé.

Les composés des co-produits de pressage des grenades ayant démontré un intérêt dans les domaines agroalimentaires, nutraceutiques, thérapeutiques et des biomatériaux sont principalement les lipides contenus dans leur huile. L'originalité de ces lipides réside dans la présence d'un acide gras particulier, l'acide punique, dont certaines propriétés ont déjà été élucidées, et d'autres sont en cours d'investigation. Dans l'optique de la valorisation des co-produits de pressage des graines de grenade, la quantification de cet acide gras paraît donc indispensable.

### 1.3.2. Péricarpes

Le péricarpe (couramment appelé peau, cuir, enveloppe) de grenade est constitué de l'exocarpe, correspondant à la partie la plus externe d'aspect ciré, du mésocarpe, le tissu situé en dessous d'aspect spongieux et de couleur variant du blanc, jaune, au marron et de l'endocarpe [46]. Les aspects de ces tissus dépendent principalement de la variété de grenade considérée et du stade de développement du fruit [98]. Le péricarpe constitue le co-produit principal de l'industrie de la grenade puisque c'est la partie non comestible du fruit. Au vu de la grande proportion de péricarpes dans les grenades, de nombreuses études ont porté sur leur caractérisation chimique ou biologique à des fins de valorisation. Ces études ont été recensées dans plusieurs revues ces trois dernières années [52,98–103]. Il est établi de manière consensuelle que les composés principaux retrouvés dans les péricarpes de grenades sont les glucides (> 60 %), incluant les fibres alimentaires (> 10 %), et les polyphénols (> 10 %). Les composés minoritaires ou non ubiquitaires sont les acides aminés et protéines (< 10 %), vitamines, lipides (< 10 %) dont acides gras, stérols et terpènes, alcaloïdes dérivés de la pelletierine (< 1 %), minéraux (< 1 %) [52,99,101,104]. Les péricarpes de grenades et leurs extraits ont montré des activités antioxydantes, antimicrobiennes, antifongiques, et autres bénéfiques pour la santé humaine qui ont conduit à la recherche d'applications dans divers secteurs, notamment nutraceutiques, pharmaceutiques, agroalimentaires et des biomatériaux [52,99,100,102]. Ces propriétés seraient liées principalement à la présence de glucides, fibres alimentaires et polyphénols, dont les teneurs, principaux composés et activités biologiques seront détaillés ci-après.

- **Glucides et fibres alimentaires**

D'après l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) [105], les glucides sont des hydrates de carbone, ou polyalcools, qui peuvent être classés en quatre familles selon leur degré de polymérisation : les sucres (1-2), oligosaccharides (3-9), polysaccharides (>9) et polyols. Cette définition ne comprend pas certaines macromolécules classées dans les fibres alimentaires [106],



pourtant à l'origine de l'intérêt nutritionnel des péricarpes de grenades. Les composés glucidiques des péricarpes de grenades, excluant ceux appartenant aux fibres alimentaires, seront donc présentés dans une première partie, et la seconde exposera les données relatives aux fibres diététiques.

Les composés glucidiques non compris dans les fibres alimentaires sont les sucres et polyols mono- et di-saccharidiques. Les principaux décrits dans les péricarpes de grenades sont le glucose et le fructose [101] (figure 1.7), à des teneurs de 1-5 % et 1-7 % g/g ms, respectivement. Les autres sont le mannitol (0,05-0,3 %), le maltose (moins de 0,05 %), et le saccharose (moins de 0,003 %) [55,107,108]. Les teneurs observées dans les péricarpes de grenades étant faibles, à titre d'exemple la canne à sucre contient plus de 20 % de saccharose [109], ces co-produits ne constituent pas une source alternative à ces composés. De plus, malgré l'amélioration des qualités organoleptiques et de textures engendrées par l'ajout de glucose et fructose dans les aliments, les effets nocifs sur la santé humaine en font des additifs à éviter [105].

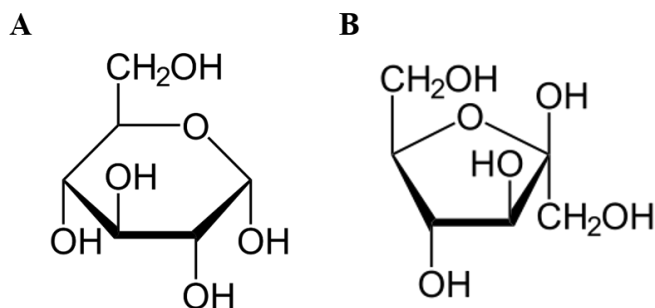


Figure 1.7 : Structures chimiques du glucose (A) et du fructose (B).

À l'inverse, les fibres alimentaires ou diététiques ont un rôle nutritionnel impliquant l'augmentation la satiété, la diminution du cholestérol, et la favorisation du transit [110]. Elles sont composées de polysaccharides (cellulose, hémicelluloses, pectines) et lignines, et correspondent à la fraction non digérée par l'Homme des aliments. Les péricarpes de grenades (Gabès, Tunisie) contiennent 28 à 34 % de fibres diététiques (g/g ms) dont 7 à 8 % (g/g ms) de pectines [111]. D'autres variétés tunisiennes comportent 33 à 62 % de fibres diététiques (g/g ms) dont 17 à 23 % de cellulose, 21 à 41 % de lignines, et 14 à 23 % de pectines (g/g ms) [112]. Des teneurs similaires en pectines sont retrouvées dans les péricarpes d'une variété d'Inde, avec 24 % de pectines [113]. Par ailleurs, les teneurs importantes en xylose et arabinose ont été décrites dans la fraction glucidique des péricarpes [112], et résulteraient de la présence d'arabinoxylanes.

Les fibres diététiques ont actuellement diverses applications dans les domaines de l'agroalimentaire, matériaux, nutraceutique. Parmi celles-ci, la cellulose, formée d'unités glucose, est utilisée à 98 % dans l'industrie du papier, textile et emballage. Elle entre aussi dans la composition de gels pour ses propriétés de stabilisation et de texture, et dans la production de bioéthanol [114]. Les hémicelluloses contrairement à la cellulose sont des polymères d'hétérosaccharides branchés, dont les applications sont notamment dans le domaine des biomatériaux. Par exemple, couplées au zirconium, elles forment un gel résistant à l'eau pouvant entrer dans la composition d'enrobages ou d'adhésifs [115]. Les pectines sont des biopolymères gélifiants et

stabilisants. Ces propriétés sont intéressantes pour l'industrie agroalimentaire pour changer la consistance des produits (gelées, confitures, yaourts, crème glacée et autres) et remplacer les graisses dans certaines préparations. Les sources de pectines sont actuellement l'écorce d'agrumes (citron jaune 56 %, citron vert 30 %, et orange 13 % du marché) et la bagasse de pomme (14 % du marché) [116]. Les co-produits d'agrumes et pommes contiennent respectivement 17 à 34 % et 4 à 14 % (g/g matière sèche) de pectines. Les co-produits de grenade ont une teneur en pectine proche de la bagasse de pomme, ils pourraient donc intégrer la même filière de valorisation [117,118]. Les pectines trouvent aussi des usages en cosmétique (texturants, stabilisants et agents anti-âge), pharmaceutique (adhésifs médicaux, encapsulation, radioprotection) et nutraceutique (encapsulation, prébiotique) [116].

Les applications potentielles d'extraits de péricarpes de grenades pourraient ne pas résider uniquement dans leur teneur en fibres diététiques. En effet, une décoction des co-produits de grenade composée à 10 % de polysaccharides (g/g ms) et 12 % d'ellagitannins (g/g ms) a une activité prébiotique (stimulation *in vitro* du développement des souches *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* bénéfiques pour le microbiote intestinal) générant un potentiel d'applications dans l'agroalimentaire. Cette décoction pourrait entrer dans la composition d'aliments transformés comportant des qualités physiologiques supplémentaires aux propriétés nutritionnelles normales (« *functional food* »), ou des compléments alimentaires [119]. Par ailleurs, l'activité anti-inflammatoire de péricarpes de grenades (Wonderful, Californie) est liée à la fois aux polysaccharides présents, mais aussi à la teneur en polyphénols (punicalagine, punicaline, acide gallique, acide ellagique) [120].

- **Polyphénols**

Les composés phénoliques (8 000 connus) sont très largement retrouvés dans les plantes. D'un point de vue chimique, ils sont caractérisés par la présence d'un noyau aromatique lié à au moins un groupement hydroxyle. Les polyphénols sont des composés phénoliques contenant plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés. Ils peuvent être divisés en différentes classes, les flavonoïdes et les tannins étant les plus nombreux. Certains se condensent, polymérisent, sont glycosylés pour former des dérivés avec d'autres propriétés physico-chimiques. Les polyphénols sont à l'origine de l'astringence et l'amertume (acides hydroxybenzoïques de la bière), du trouble (gallotannins de la bière), de la couleur (anthocyanes du vin et du sorgho), et des propriétés antioxydantes (procyanidines du chocolat) de différents aliments et préparations. Ces composés ont de nombreuses propriétés : antifongiques, antibactériennes, et nutritionnelles. Les analyses usuelles quantifient les polyphénols totaux (test de Folin-Ciocalteu), les flavan-3-ol et proanthocyanidines ou tannins condensés (test à la vanilline), et tous les types de composés phénoliques sont détectables par spectrométrie d'absorption de la lumière UV-visible ou de fluorescence [121].

La teneur en polyphénols totaux des péricarpes de grenades varie fortement selon l'origine et la variété considérées : de 70 à 430 mg eag/g ms (mg équivalent acide gallique par g de matière sèche). Les co-produits de grenade sont considérés comme riches en polyphénols car la teneur est comparable à celle du thé vert qui contient jusqu'à 200 mg eag/g ms de polyphénols [122]. D'autre part, la teneur en polyphénols

est décrite comme directement corrélée à la capacité antioxydante des co-produits de grenade, c'est pourquoi les polyphénols sont parfois appelés antioxydants. De plus, au vu des différences entre les variétés de grenade, la caractérisation des variétés occitanes doit comprendre l'évaluation de la teneur en composés phénoliques.

Les polyphénols des péricarpes de grenades majoritaires identifiés (figure 1.8) appartiennent aux classes des flavonoïdes (flavonols comme la catéchine, anthocyanidines comme la cyanidine) et acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques comme l'acide gallique et l'acide ellagique). Les polymères issus de leur condensation ou glycosylation sont aussi retrouvés : respectivement les tannins condensés ou anthocyanes (cyanidine-3-glucoside, cyanidine-3,5-diglucoside), tannins hydrolysables de type gallotannins et de type ellagitannins (punicalagine, punicaline, granatine B) [123]. Les différentes classes de polyphénols ont été quantifiées par des méthodes colorimétriques, comme pour les polyphénols totaux. Les anthocyanes apparaissent comme minoritaires derrière les tannins condensés et les flavonoïdes totaux. En effet, Fischer et al. [59] ont évalué ces teneurs dans des extraits de péricarpes de grenades (Pérou), et ont montré que les ellagitannins (98,4–100,0 % des polyphénols totaux) sont majoritaires devant les anthocyanes (0–1,0 %), les acides hydroxybenzoïques (0–0,6 %) et les gallotannins (moins de 0,1 %).

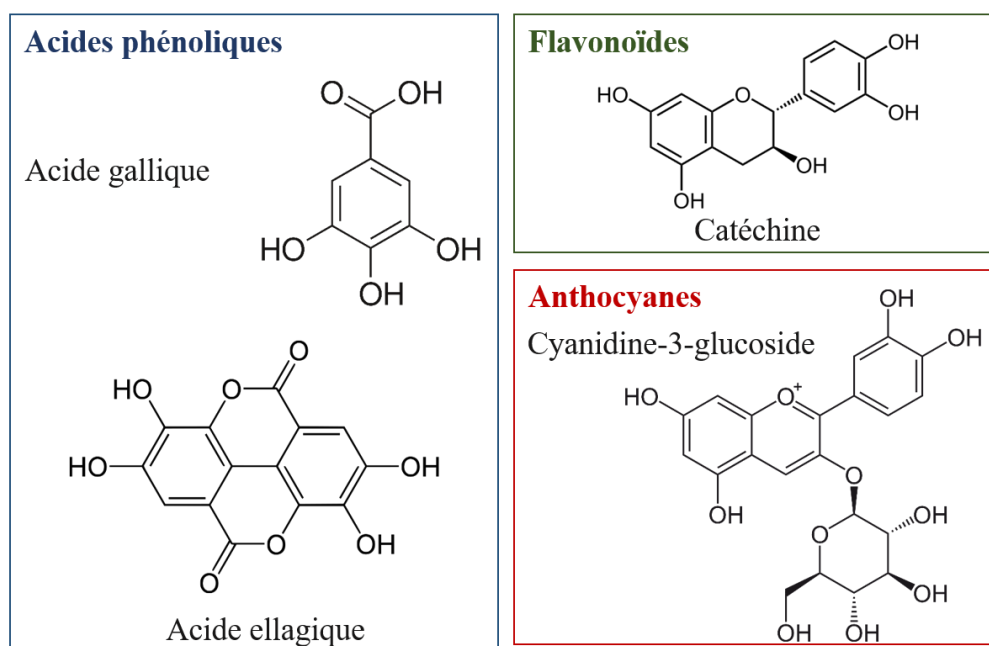


Figure 1.8 : Familles de polyphénols présents dans les péricarpes de grenade.

Les ellagitannins, polyphénols majoritaires des péricarpes de grenade, sont des tannins hydrolysables, c'est-à-dire des composés contenant un ou plusieurs fragments dérivés de l'acide ellagique ou gallique liés par estérification à un monosaccharide (souvent le glucose). Présents majoritairement dans les baies et noix, les teneurs en ellagitannins varient dans la plupart des végétaux de 0,03 mg/g à 86,2 mg/g selon le composé et la matière considérés. D'un point de vue physiologique, ils sont métabolisés par le microbiote intestinal humain, et l'acide ellagique ainsi libéré est ensuite transformé en métabolites absorbés par l'intestin (urolithines A et B) [124]. Comme précisé précédemment, les taux élevés de composés phénoliques (jusqu'à de 400 mg/g ms eag)

et notamment ellagitannins dans les extraits alcooliques de péricarpes de grenades (Inde) seraient à l'origine de leur activité antioxydante. La capacité antioxydante d'un composé ou d'un extrait peut être mesurée par différentes méthodes, les plus utilisées étant liées à la capacité à piéger les radicaux libres (acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique), ABTS ou 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle, DPPH), et la mesure du pouvoir réducteur (sur l'ion ferrique Fe(+III)). En pratique, le pouvoir antioxydant est calculé par rapport à un standard, le Trolox (acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique), analogue de la vitamine E. En ce qui concerne les co-produits de grenade, différents extraits issus de plusieurs variétés ont montré une activité antioxydante comprise entre 2,0 et 2,9 mmol/g (test avec ABTS, équivalent Trolox, ms) ; 1,8–2,7 mmol / g (test avec DPPH équivalent Trolox, ms) et 1,1–2,1 mmol / g (test avec Fe(+III) équivalent Trolox, ms) [59,112,125]. Celle-ci est comparable à celle de l'acide ascorbique et de l'hydroxytoluène butylé (BHT), des antioxydants commerciaux. Ces mêmes extraits ont montré une activité antimutagène contre des agents mutagènes directs et indirects (l'azide de sodium, le sulphonate de méthylméthane, le 2-aminofluorène et le benzo(a)pyrène) sur des souches de *Salmonella typhimurium* (entre 67 et 92 % d'inhibition de mutagenicité) [126].

Les deux ellagitannins les plus décrits dans les péricarpes de grenades sont la punicaline et la punicalagine (figure 1.9), dont les noms se réfèrent au genre de la grenade : *Punica*.

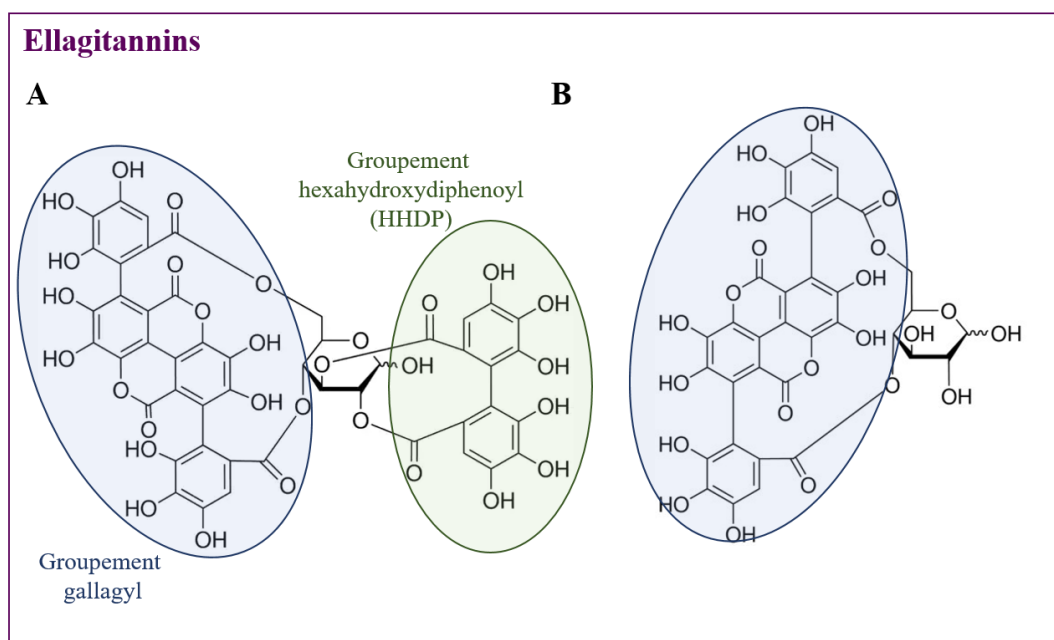


Figure 1.9 : Structures de la punicalagine (A) et de la punicaline (B).

La teneur en punicalagine (2 – 453 mg/g ms soit 74 % des polyphénols totaux) est corrélée positivement avec l'activité antifongique ( $r = 0,61$ ) d'extraits de péricarpes de grenades (Europe, Moyen-Orient) sur le pathogène végétal *Fusarium oxysporum*. Les extraits hydroalcooliques ralentissent le développement de celui-ci autant que le dicloran, un fongicide de synthèse spécifique de cette souche fongique, et pourraient ainsi devenir des alternatives aux fongicides synthétiques [127]. Ces résultats sont en

accord avec l'étude menée en 2012 par Glazer et al. [128] dans laquelle des extraits de péricarpes de grenades (PG102-3, PG203-4 et Wonderful, Israël) enrichis en punicalagine (jusqu'à 76 % des ellagitannins totaux) diminuaient la croissance de souches *Alternaria alternata*, *Stemphylium botryosum*, et *Fusarium* spp. Ces souches sont responsables de dommages causés aux fruits durant leur conservation, rendant l'utilisation d'un antifongique naturel et non toxique pour l'homme primordial. La punicalagine extraite de péricarpes de grenades (Brésil) a aussi une activité fongicide (concentration inhibitrice minimale MIC 62,5 µg/mL) sur des dermatophytes humains et notamment *Trichophyton rubrum*. Toutefois, l'antifongique d'origine bactérienne nystatin (MIC 0,8 µg/mL) reste plus performant. Des études approfondies seraient nécessaires pour rendre les extraits de péricarpes de grenades attractifs dans le traitement des dermatophytoses [129]. Finalement, les extraits de péricarpes de grenades enrichis en punicalagine (40 % g/g ms) ont montré un intérêt dans la prévention des maladies cardiovasculaires liées à l'obésité. Dans une étude de 8 semaines menée sur des rats obèses, l'ingestion de 150 mg/kg de l'extrait diminue la prise de poids globale, la teneur en triglycérides et cholestérol dans les tissus cardiaques, et l'augmentation des marqueurs sérologiques liés à l'obésité (créatine kinase et lactase déshydrogénase). L'étude mécanistique sur des cardiomyocytes a conclu que l'extrait enrichi en punicalagine et la punicalagine seule induisent une régulation de l'augmentation de la teneur en graisses du cœur et une protection au stress oxydant [130].

L'hydrolyse de ces ellagitannins conduit à la libération d'acide ellagique, un acide hydroxybenzoïque ayant de multiples propriétés d'intérêt pour les secteurs agroalimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques, et matériaux. L'acide ellagique a une forte activité antioxydante, à la fois pour la capture de radicaux libres (comme les espèces réactives de l'oxygène ROS) et la prévention de l'oxydation des lipides (respectivement 75 % de pouvoir piégeant et concentration inhibitrice médiane IC<sub>50</sub> < 4 µg/mL). *In vitro*, l'acide ellagique (100 µg/L) augmente l'activité d'enzymes antioxydantes de fibroblastes de mammifère de plus de 45 % (superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxydase (GPX)). En outre, l'acide ellagique a aussi une activité antiproliférative sur des cellules de cancer osseux (90 % d'apoptose après 48 heures d'incubation). Ce composé pourrait devenir un potentiel agent anticancéreux [131]. L'acide ellagique entre par ailleurs dans la formulation de différents produits dermocosmétiques (principalement pour matifier, raffermir la peau) [132,133], mais pourrait aussi participer au traitement de l'hyperpigmentation. En effet, des extraits de feuilles de *Juglans regia* L. (noyer), d'écorce de *Castanea sativa* Mill. (châtaigner), et de feuilles d'*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. (gommier rouge des rivières) contenant respectivement 16,3, 2,8 et 0,3 % d'acide ellagique (g/g ms) ont été utilisés dans ce but [134]. L'acide ellagique montre aussi un intérêt dans la conception de biomatériaux, d'une part au sein de dispositifs médicaux de traitement de plaies chroniques. En effet, l'ajout de cet antioxydant (0,5–2 % g/g) à une matrice collagène-chitosane (ratio 3:7) permet de protéger *in vitro* les fibroblastes (COS 7, 69 % de cellules viables après 24 h avec 2 % d'acide ellagique) du stress oxydatif (induit par radiation UV pendant 10–30 min). La libération prolongée d'acide ellagique (de 65 à 82 % en 120 h) pourrait conduire *in vivo* à une réparation plus rapide des tissus endommagés [135]. D'autre part, une étude a montré que l'acide ellagique extrait de péricarpes de grenades pourrait être utilisé dans les électrodes de batteries au lithium. Là encore ce sont ses propriétés antioxydantes, liées à la chélation des ions

lithium, qui permettent d'effectuer une lithiation réversible et stable pendant plusieurs cycles de charge et décharge. Le modèle de batterie obtenu a une capacité réversible de  $400 \text{ mA.h.g}^{-1}$  initiale qui diminue à  $320 \text{ mA.h.g}^{-1}$  après plusieurs cycles [136]. Les batteries au lithium construites avec des électrodes non biosourcées ont des capacités réversibles comprises entre 385 et  $748 \text{ mA.h.g}^{-1}$  : la technologie développée avec l'acide ellagique doit donc être améliorée pour devenir une alternative aux électrodes actuelles [137].

Dans les péricarpes de grenade, la teneur en acide ellagique libre est plus faible (2,3–6,4 % g/g ms) [59] que d'autres matières premières ayant montré leur intérêt pour des préparations cosmétiques comme les feuilles de noyer *Juglans Regia* L. (16,3 % g/g ms) [134]. Cependant, la teneur élevée en ellagitannins hydrolysables en fait une source indirecte d'acide ellagique. Une méthode en trois étapes (extraction des tannins, hydrolyse et purification) a conduit à un rendement de 3,5 % (g/g ms) d'acide ellagique d'une pureté supérieure à 90 % de péricarpes de grenades (Chine) [138]. Cette méthode pourrait par conséquent être appliquée avec des co-produits d'une variété de grenade à haute teneur en acide ellagique, et aboutir à un haut rendement en acide ellagique à haute pureté.

La seconde famille de polyphénols présente dans les péricarpes de grenades est celle des anthocyanes, à une teneur inférieure à 1 % (g d'équivalent cyanidine-3-glucoside  $\text{ec}3\text{g/g ms}$ ) [59,123]. Parmi les anthocyanes présentes dans les péricarpes de grenade, toutes sont glycosylées et appartiennent à la classe des anthocyanidines. Les principales sont la cyanidine-3-glucoside à une teneur relative de 49,4 %, le pelargonidine-3-glucoside (24,6 %), la cyanidine-3,5-diglucoside (12,4 %) et les minoritaires sont la pelargonidine-3,5-diglucoside, la delphinidine-3-glucoside et la delphinidine-3,5-diglucoside [123]. Les anthocyanes sont des flavonoïdes responsables de la couleur des baies comme le raisin. Ces composés changent de couleur selon le potentiel hydrogène (pH) du milieu dans lequel ils se trouvent : en milieu acide, elles seront orange, rouge ou mauve et en milieu alcalin incolore, jaune ou bleu [121]. Actuellement, les propriétés colorantes des anthocyanes sont utilisées en cosmétique (teinture pour cheveux), agroalimentaire (remplacement de colorants allergènes ou moins durables) [139]. Les teneurs sont faibles dans les péricarpes de grenades par rapport à d'autres sources : la bagasse de raisin (Pinot Noir, Brésil) contient 1,6 % (g  $\text{ec}3\text{g/g ms}$ ) [140] et la bagasse de pomme (mélange, États-Unis) 0,8 % (g  $\text{ec}3\text{g/g ms}$ ). Leur étude approfondie dans les co-produits de grenade paraît donc peu pertinente de ce point de vue.

Les péricarpes de grenades ont montré des teneurs élevées en glucides et composés phénoliques par rapport à certains co-produits existants. Ces composés ont des propriétés physico-chimiques pertinentes pour plusieurs applications, et certaines formes de valorisation ont déjà été étudiées. Par exemple, pour le secteur de l'alimentation humaine, les co-produits de grenade augmentent la capacité antioxydante de yaourts (jusqu'à 6 fois), et ainsi améliorent leur apport nutritionnel [141].

### 1.3.3. Conclusion

Les co-produits de la transformation des grenades, péricarpes et co-produits de pressage des graines, contiennent principalement des fibres et des composés

phénoliques ou lipidiques. Les types de fibres retrouvés sont aussi présents dans de nombreux co-produits d'agroalimentaire, alors que des polyphénols et lipides originaux sont présents, des types ellagitannins et acides gras poly-insaturés conjugués, respectivement. Ces deux familles de composés semblent donc les plus pertinentes à étudier dans les co-produits, puisque seraient à l'origine de valorisations de plus haute valeur ajoutée. Leur présence ou teneur dans les co-produits de grenade varie selon les études. Ces variations peuvent être induites d'une part par les méthodes d'extraction et d'analyses employées, et d'autre part par des variations dans les co-produits eux-mêmes, qui seront développés dans les parties suivantes.

## **1.4. Extraction des composés ciblés des co-produits de grenade**

Les procédés d'extraction des composés présents dans la matière végétale sont essentiellement basés sur leur diffusion entre deux phases : solide et fluide. Cette diffusion résulte d'un transfert de masse entre l'échantillon solide et le fluide, et est régie par la masse moléculaire et la solubilité des substances extractibles, le gradient de concentration entre les phases, la surface de la matrice et le volume du milieu, la viscosité et la constante diélectrique du fluide. Ces paramètres sont influencés par des facteurs opératoires.

Dans le cas des co-produits de la grenade, la pression, la température, le type et les caractéristiques du fluide, les additifs, le temps de mélange, la taille des particules de la matrice et le ratio solide/liquide ont été largement étudiés. Ces paramètres peuvent amener à la dégradation des molécules d'intérêt en fonction de leurs propriétés et leur intégrité doit donc être surveillée tout au long du processus.

Les procédés ayant été étudiés pour extraire les composés des co-produits de la grenade incluent l'extraction par macération, au Soxhlet, assistée par ultrasons (UAE), micro-ondes (MAE), haute pression (HPE), des enzymes (EE), ainsi que l'extraction par fluide supercritique (SFE) et le pressage à froid pour les graines de grenades uniquement. Ces procédés d'extraction sont principalement axés sur les composés phénoliques, les sucres et les fibres alimentaires des péricarpes, ou sur les acides gras et l'huile des co-produits de pressage des graines. Nous nous concentrerons sur les procédés permettant d'extraire les principaux composés à valeur ajoutée des co-produits de grenade : les polyphénols et les lipides [142].

### **1.4.1. Extraction des lipides des co-produits de pressage des graines**

L'extraction des co-produits de pressage des graines de grenades a principalement pour but d'améliorer le rendement en l'huile, car elle contient les acides gras conjugués poly-insaturés d'intérêt, principalement l'acide punicoïque ((9Z,11E,13Z)-9,11,13-Octadécatriénoïque) et ses isomères. Outre la méthode standard d'extraction de l'huile, utilisant un appareil Soxhlet et de l'hexane, l'extraction assistée par ultrasons (UAE), l'extraction par fluide supercritique (SFE) et l'extraction à l'hexane surchauffé (SHHE) ont été optimisées afin d'améliorer le rendement et la qualité de l'huile, la durée du processus et/ou réduire le coût environnemental.

### 1.4.1.a. Extractions conventionnelles

- **Extraction par pressage à froid**

Le pressage à froid est la méthode d'extraction présentant les risques les plus faibles pour la santé, puisque la matière est extraite sans addition de fluide (figure 1.10), et est employée depuis de nombreuses années à travers le monde.

Son principal inconvénient réside dans les rendements d'extraction qui sont très réduits par rapport aux méthodes extractives avec des fluides [143]. À partir de la partie interne de la graine de grenade, Eikani et al. [144], Schubert et al. [145] et Khoddami et al. [84] ont obtenu un rendement en huile de 4,3-6,9 % (g/g). Ces rendements ne sont pas représentatifs de la teneur en huile totale contenue dans la graine, qui peut être déterminée par extraction au Soxhlet.

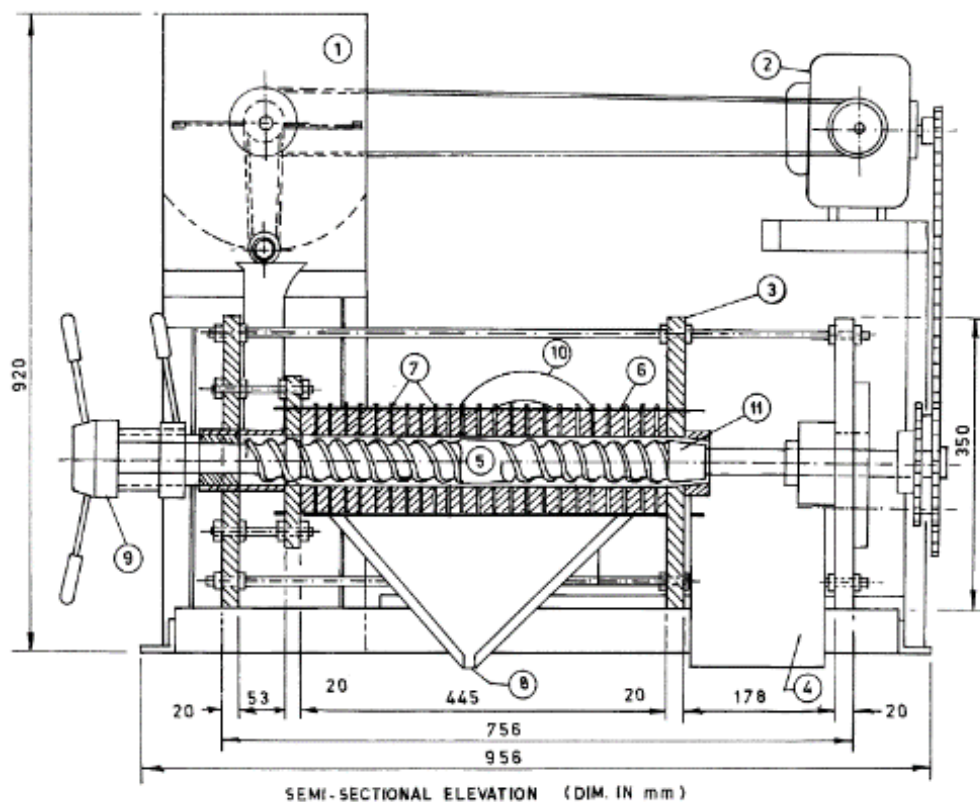


Figure 1.10 : Exemple d'appareillage pour l'extraction de l'huile à froid. Vue semi-sectionnelle d'une presse à vis développée par Singh et al. [143]. (1) trémie, (2) réducteur de vitesse, (3) châssis, (4) plateau de récupération du tourteau, (5) arbre à vis sans fin, (6) barillet, (7) entretoises, (8) plateau collecteur d'huile, (9) réglage du jeu, (10) moteur électrique, (11) mécanisme d'étranglement.

- **Extraction au Soxhlet**

L'extraction au Soxhlet (figure 1.11) est une méthode de référence pour l'extraction totale de l'huile des graines oléagineuses [146] dans laquelle l'échantillon est placé dans une cartouche traversée par un solvant organique. L'extraction des composés depuis la matrice est réalisée en plusieurs cycles de mise au contact avec le solvant, grâce à la mise en place d'un reflux et des caractéristiques de l'appareil Soxhlet.



L'extraction est donc effectuée en continu et dure généralement 5-6 heures lorsque le *n*-hexane ou l'éther de pétrole sont utilisés.

Tian et al. [89] ont comparé différents solvants organiques apolaires pour l'extraction de l'huile de grenade. L'éther de pétrole montre un rendement en huile (21 % g/g ms) légèrement supérieur à ceux obtenus avec du *n*-hexane, de l'acétate d'éthyle, de l'éther diéthylique, de l'acétone et de l'isopropanol (19-20 % g/g ms, respectivement). Néanmoins, avec moins de 1 % de différence de rendement, le *n*-hexane, l'acétate d'éthyle et l'éther diéthylique pourraient tous être envisagés pour l'extraction de l'huile.

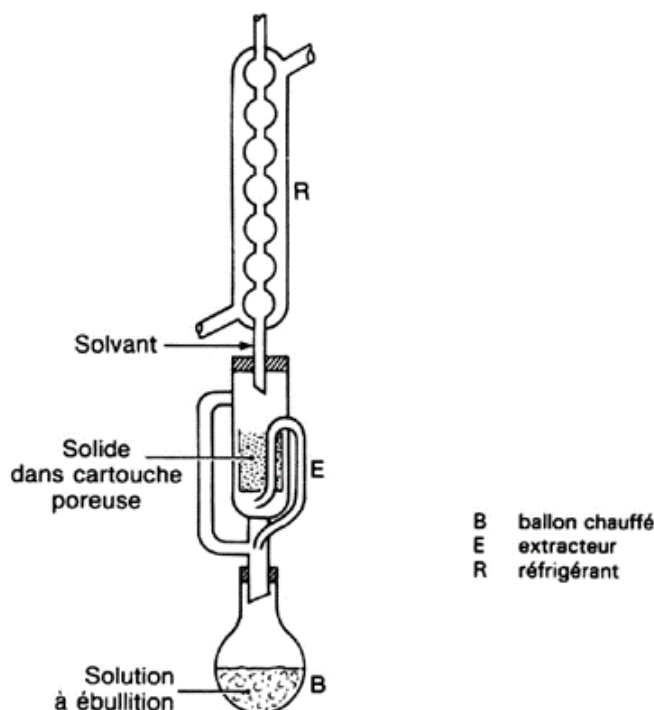


Figure 1.11 : Extraction par Soxhlet. Reproduit depuis Leybros & Frémeaux [147].

Le rendement en huile de la partie interne de la graine de grenade obtenu par extraction au Soxhlet (3-6 h) se situe entre 19 et 21 % [89,148], et celui des co-produits de pressage des graines autour de 24 % [62]. Ces différences entre partie interne ou co-produit de pressage peuvent résulter de l'origine des échantillons, qui sera discutée dans la partie suivante.

L'extraction au Soxhlet a principalement été mise en œuvre dans le cadre du développement ou de l'optimisation d'une autre méthode d'extraction [89,148] ou pour établir la teneur en huile totale de la matière [62]. En effet, l'extraction au Soxhlet de la partie interne des graines de grenades permet d'obtenir presque deux fois plus d'huile que le pressage à froid [84,144]. Cependant, elle montre certaines limitations incluant l'altération des composés thermolabiles, l'incompatibilité avec les procédés industriels (durée, coût), et la toxicité liée aux solvants.

Pour la caractérisation à l'échelle laboratoire de l'huile des co-produits de grenade, la dégradation des composés thermolabiles semble être le phénomène le plus important. Une manière de préserver les composés thermolabiles est d'employer la macération à

froid [149]. Néanmoins, son efficacité est limitée par plusieurs facteurs et notamment la vitesse de diffusion des extractibles entre les deux phases lorsque le système s'approche de l'équilibre [150]. Une manière de s'affranchir de cette limitation est le renouvellement du fluide d'extraction, et d'effectuer une macération jusqu'à épuisement de la matière. De cette manière, Ferraz et al. [151] ont extrait plus de 80 % et 90 % des triglycérides présents dans un sérum humain, avec respectivement de l'hexane et de l'éther, et Stamenkovic et al. [152] ont extrait autant d'huile qu'avec le Soxhlet, soit 20 % et 19 % respectivement, d'un tourteau de graines de moutarde avec de l'hexane. Bien que cette extraction puisse être conduite à froid et limite ainsi l'altération des composés de la matrice, elle nécessite de larges volumes de solvant ainsi que des durées très importantes. Pour réduire la durée d'extraction de l'huile des graines de grenade, des études ont été menées sur l'extraction assistée par ultrason (UAE).

#### 1.4.1.b. Extraction assistée par ultrasons (UAE)

L'extraction assistée par ultrasons (UAE) repose sur le principe de la création de zones de cavitations par des ondes ultrasonores dans le milieu (figure 1.12). Ces zones permettent de faire varier localement la pression et la température, et entraînent notamment la dégradation des cellules conduisant à la libération des extractibles.

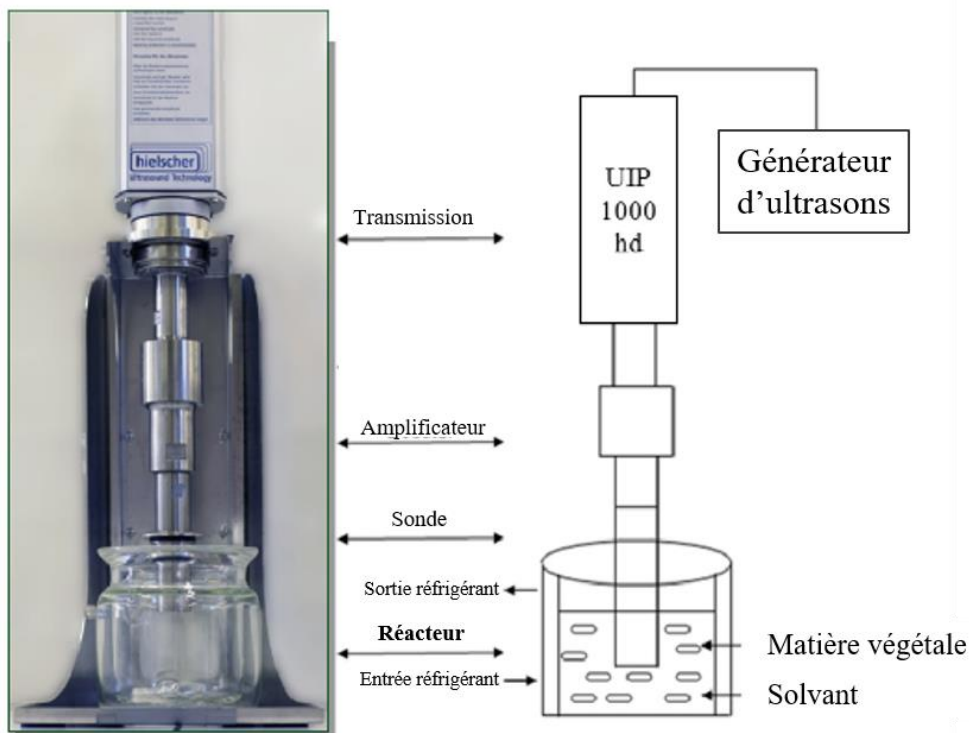


Figure 1.12 : Extraction assistée par ultrasons. Adapté depuis Petigny et al. [154].

Les effets de la taille des particules (0,2-3,4 mm), de la température (20-80 °C), du ratio solide/liquide (1/4-1/20), de l'amplitude (20-60 %), ainsi que la durée et le ratio d'intervalle (5/15-2/1) des impulsions ont été évalués par Goula et al. [153] sur le rendement en huile des graines de grenades pendant l'UAE avec de l'hexane. Cette étude a montré d'une part une augmentation du rendement avec la diminution de la

taille des particules et de la température. D'autre part, un ratio solide/liquide faible, un niveau d'amplitude élevé et une durée d'impulsion et un ratio d'intervalle faibles entraînent un rendement en huile compris entre 30 et 45 % selon les paramètres employés, et jusqu'à 60 % dans les conditions optimales après 20 minutes d'extraction.

Kalamar et al. [87] ont également optimisé l'UAE de graines de grenades dans l'hexane, en utilisant la température (20-6 °C), le ratio solide-liquide (1/8-1/20), le niveau d'amplitude (30-60 %) ainsi que la durée et le ratio d'intervalle (3/4, 2/1) des impulsions. Parmi ces paramètres, l'augmentation du ratio solide/liquide et de l'amplitude des impulsions ainsi que la diminution de la température et du ratio d'intervalle augmentent le rendement en huile, jusqu'à 18 % après 10 minutes d'extraction. Les effets de la température, de l'amplitude et le ratio d'intervalle des impulsions sont similaires entre les deux études. Les conclusions sont cependant opposées concernant l'effet du ratio solide/liquide et de la durée des impulsions. Les tailles de particules variables peuvent expliquer ces différences, de même que les conditions opératoires. En effet, les effets des paramètres étudiés ne sont pas linéaires sur les rendements d'extraction, et dans les deux études, les valeurs des paramètres optimisés ne se trouvent pas dans les mêmes intervalles.

Enfin, Tian et al. [89] ont choisi d'étudier les effets de la puissance des ultrasons (140-180 W), de la température (35-45 °C), du ratio solide-liquide (1/9-1/11), et de la durée d'extraction (20-40 min) sur le rendement en huile par UAE en mode continu, avec de l'éther de pétrole. Cette étude a montré que la durée d'extraction a un effet négligeable sur le rendement en huile par rapport aux autres paramètres. L'augmentation de la puissance des ultrasons et du ratio solide-liquide diminue le rendement en huile, alors que celle de la température jusqu'à 40 °C l'augmente, pour un rendement maximal de 25 % après 36 minutes d'extraction. En mode continu, l'effet de la température est donc différent du mode pulsé, mais celui du ratio solide-liquide est similaire.

Les rendements obtenus en UAE ont été comparés à ceux de l'extraction au Soxhlet dans plusieurs études. Abbasi et al. [148] ont montré une diminution de 3 % du rendement en huile avec l'UAE. Néanmoins, la qualité de l'huile obtenue par UAE est équivalente avec celle de l'extraction au Soxhlet, puisque les profils d'acides gras sont similaires entre les huiles. La teneur en acide punicique par exemple varie de 81,7-82,0 % dans l'huile extraite par UAE à 81,4-81,5 % dans l'huile obtenue par Soxhlet. En revanche, Tian et al. [89] ont montré une augmentation de presque 5 % du rendement avec l'UAE, par comparaison avec l'extraction au Soxhlet. L'analyse des principaux acides gras des huiles (acides palmitique, stéarique, oléique, linoléique et punique) a révélé des différences significatives entre leurs teneurs relatives, mais négligeables au regard des écarts de moins de 1 à 3 %.

L'évaluation de l'intérêt de l'UAE pour extraire l'huile de grenade a montré des résultats mitigés bien que la durée du procédé soit fortement réduite (<1 h) comparée à l'extraction par Soxhlet (3-6 h). L'inconstance des rendements en huile doit être limitée pour son emploi à plus grande échelle, mais la maintenance de la qualité de l'huile semble prometteuse. De plus, ce procédé implique des solvants nocifs comme l'hexane ou l'éther de pétrole incompatibles avec les applications dans certaines industries, notamment cosmétiques ou pharmaceutiques. Plusieurs alternatives ont

émérgé depuis des années, et plus particulièrement l'extraction par fluide supercritique (SFE) a montré sa faisabilité pour extraire l'huile de grenade.

#### 1.4.1.c. Extraction par Fluide Supercritique (SFE)

L'extraction par fluide supercritique (SFE) est fondée sur le principe de la diffusion d'un soluté d'une matrice vers un fluide à l'état supercritique (figure 1.13). Cet état est obtenu dans des conditions de température et de pression dépendantes de la nature du fluide et lui confère des propriétés de diffusion et de densité améliorant sa capacité d'extraction. Par exemple, le dioxyde de carbone atteint son état supercritique au-delà de 7,4 MPa et 31 °C.

Dans le cas de l'huile de grenade, le dioxyde de carbone est utilisé seul ou en combinaison avec un co-solvant et permet d'obtenir un rendement en huile entre 4 et 22 % [88,155,156]. Les études concordent sur l'importance de la pression appliquée, qui augmente le rendement en huile lorsqu'elle est plus importante. Cependant, l'impact de la température est moins clair, probablement à cause de la présence d'un additif ou des débits variables.

Lorsque le dioxyde de carbone est utilisé avec de l'hexane à un débit non précisé [155], une température proche de 40 °C permet d'obtenir un rendement en huile plus élevé qu'à 60 °C. Lorsque le dioxyde de carbone est utilisé seul entre 6,6 et 23,4 L/h [156], à basse pression (13,2-32 MPa), le rendement en huile diminue avec l'augmentation de la température de 33 à 67 °C, alors qu'à haute pression (32-46,8 MPa), le rendement augmente avec des températures plus élevées.

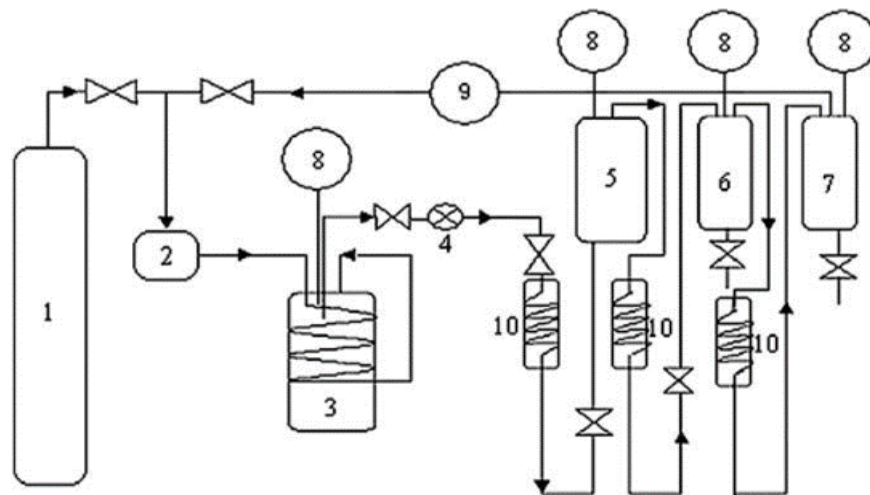


Figure 1.13 : Schéma de l'extraction par fluide supercritique (SFE) proposé par Liu et al. [156]. (1) CO<sub>2</sub> liquide, (2) Filtre, (3) Bain réfrigérant, (4) Homogénéiseur, (5) Pompe, (6) Cartouche d'extraction, (7) Séparateur I, (8) Séparateur II, (9) Manomètre, (10) Débitmètre.

Contrairement aux méthodes employant des solvants organiques, les rendements obtenus par SFE semblent beaucoup plus variables, et plus faibles qu'en extraction par Soxhlet. En effet, Abbasi et al. [155] ont obtenu entre 1 et 3 % (g/g) d'huile par SFE et 19 % (g/g) par extraction au Soxhlet avec de l'éther de pétrole ou du *n*-hexane. Durdevic et al. [88] et [89] ont observé la même tendance mais dans une moindre

mesure car la différence de rendement entre les deux méthodes s'élève à environ 5 %, pour des rendements de 16-22 et 21-22 % par SFE et extraction au Soxhlet, respectivement.

Concernant la qualité de l'huile obtenue, l'évolution du profil d'acides gras ne fait pas consensus parmi les études réalisées. En effet, Durdevic et al. [88] et Liu et al. [156] n'ont pas détecté de différence entre les huiles obtenues par Soxhlet ou SFE, alors que Abbasi et al. [155] ont montré une diminution de la teneur en acide punique et une augmentation des teneurs en acides oléique et linoléique grâce à l'emploi de SFE. Considérant que l'acide punique est le composé à l'origine de l'intérêt pour l'huile de grenade, ces derniers résultats remettent en cause l'intérêt d'employer l'extraction par fluide supercritique des graines de grenades ou leurs co-produits. Néanmoins, au vu de la forte variabilité des rendements et qualité de l'huile de grenade obtenue par SFE, il semblerait judicieux d'approfondir les recherches à ce sujet.

#### **1.4.1.d. Conclusion**

Les procédés d'extraction de l'huile de grenade décrits peuvent être classés en deux catégories. Lorsque le but est l'évaluation de la teneur totale en huile de la matière, des procédés comme le Soxhlet ou l'UAE semblent adéquats. Bien que l'usage de solvants organiques nocifs soit nécessaire, il conduit aux rendements les plus élevés. En ce qui concerne l'UAE, des études pour améliorer la robustesse de la méthode devraient être envisagées. Lorsque l'objectif est la valorisation de l'huile extraite dans des secteurs où l'innocuité du produit est primordiale, la SFE semble plus intéressante que le pressage à froid. Cependant, comme l'UAE, ce procédé semble avoir des limites notamment liées aux variations des rendements à la différence du pressage à froid dont les rendements sont proches entre les différentes études.

#### **1.4.2. Facteurs influençant l'extraction des polyphénols des péricarpes**

Les procédés d'extraction des péricarpes de grenades ont été largement étudiés pour obtenir un rendement ou une concentration plus élevés de composés structuraux et bioactifs (sucres, fibres alimentaires et composés phénoliques). Selon Brighenti et al. [142] le rendement en polyphénols n'est pas considérablement affecté par la méthode d'extraction mais plutôt par les paramètres communs à tous ces procédés. Ils ont mis en évidence que les rendements après macération, extraction assistée par ultrasons (UAE) et extraction assistée par micro-ondes (MAE) sont similaires si le ratio solide/liquide, la durée d'extraction et le solvant sont identiques. Néanmoins, d'autres auteurs ont aussi montré l'influence de la taille des particules, la température, la pression, les ultrasons dans l'extraction des polyphénols des péricarpes de grenade (figure 1.14). L'effet de chacun de ces paramètres sur les rendements en extractibles, polyphénols totaux et individuels sera détaillé dans les paragraphes suivants.

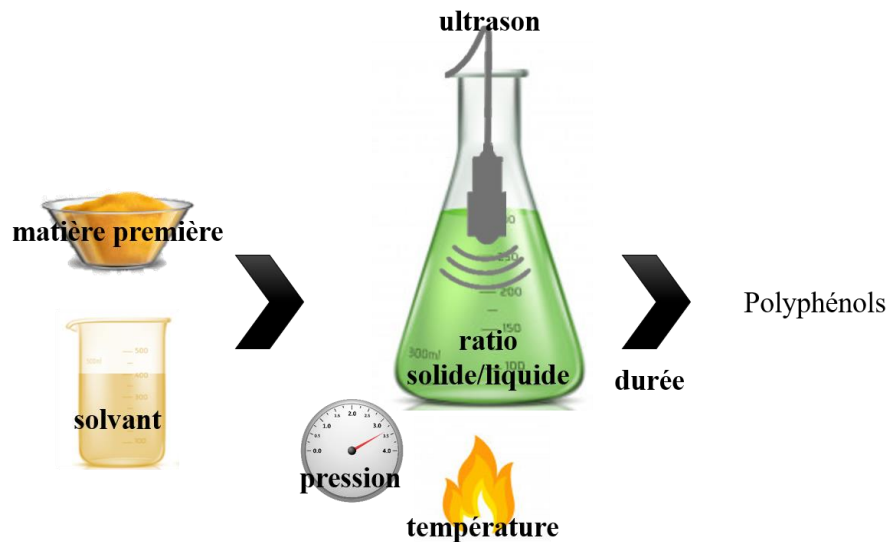


Figure 1.14 : Facteurs principaux influençant l'extraction des polyphénols des péricarpes de grenades.

#### 1.4.2.a. Taille des particules

La taille des particules de l'échantillon est directement impliquée dans l'efficacité de l'extraction, puisque la surface de contact avec le solvant ou le fluide est augmentée avec des particules plus petites, ce qui induit une meilleure diffusion du solvant dans la matrice. En effet, les particules de péricarpes de grenades broyées et tamisées (300-500  $\mu\text{m}$ ) dont la taille médiane est de 413,4  $\mu\text{m}$  ont une surface de 0,214  $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$  alors qu'une poudre dont le diamètre médian est de 7,68  $\mu\text{m}$ , 54 fois plus petit, a une surface de 1,597  $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ , soit 7 fois plus grande [157].

L'influence de la taille des particules des péricarpes de grenades a été étudiée sur les rendements d'extraction des composés phénoliques pendant la macération [158,159] et l'extraction assistée par ultrasons à haute pression (HPUAE) [159,160] dans l'eau. Toutes ces études concordent sur l'augmentation du rendement en polyphénols totaux avec la diminution de la taille des particules, de 1,1 à 1,7 fois selon les conditions. En outre, la durée de l'extraction est diminuée lorsque des particules plus petites sont employées. Par exemple, lors de la macération, l'équilibre de diffusion des composés est atteint à 2, 30, 30, 60 et 90 min pour des tailles de particules moyennes croissantes de 0,2, 0,5, 0,7, 1,4 et 3,5 mm [158]. Dans le cas de la HPUAE, 81 % des polyphénols totaux sont extraits après un cycle d'extraction avec des particules de 0,68 mm en moyenne (0,177-1,000 mm), alors que seulement 47 % des polyphénols totaux sont extraits avec des particules de 1,05 mm en moyenne (0,297-1,410 mm).

L'optimisation de l'extraction des polyphénols de grenade nécessite donc de prendre en compte la taille des particules. De plus, la diminution de la durée d'extraction engendrée par l'utilisation de particules fines implique une exposition plus courte à certaines conditions opératoires pouvant altérer les polyphénols et ainsi limiter la dégradation de ces composés.

#### 1.4.2.b. Ratio solide/liquide (s/l)

Le ratio solide/liquide (s/l) influence l'extraction des composés d'une matrice par son effet sur le gradient de concentration entre la matrice et le milieu et sur la viscosité. Le gradient augmente et la viscosité diminue lorsque le ratio s/l diminue, c'est-à-dire lorsque le volume de fluide augmente avec une quantité de matrice constante, ce qui devrait augmenter la diffusion des composés. Cependant, la diminution du ratio s/l implique une plus grande dilution des composés extraits et la consommation de plus larges quantités de fluide, et doit donc être effectuée avec parcimonie. L'effet du ratio s/l a été établi sur le rendement en polyphénols des péricarpes de grenades dans plusieurs études [158,161–163].

Lorsque les polyphénols sont extraits par macération ou UAE, la diminution du ratio s/l entraîne l'augmentation du rendement en extraction [158,161], jusqu'à 1,5 fois lorsque ce ratio diminue de 1/10 à 1/50. Cependant, Talekar et al. ont montré que la tendance est différente avec l'UAE ou la macération à haute température [163], avec un ratio s/l à partir duquel le rendement en polyphénol diminue. Dans leur étude, le rendement en polyphénols augmente de 1/5 à 1/15 puis diminue jusqu'à 1/25. Au regard de l'effet théorique de la diminution du ratio s/l, des recherches supplémentaires semblent nécessaires pour comprendre cette diminution du rendement après un ratio optimal lors de l'UAE ou la macération à haute température.

#### 1.4.2.c. Choix du solvant

Le type de solvant ou de fluide a une importance critique dans l'extraction puisque ses propriétés déterminent la diffusion des composés cibles à travers la matrice de l'échantillon [164]. Le type de solvant est le facteur le plus étudié pour l'optimisation de l'extraction des composés phénoliques des péricarpes de la grenade. Les composés phénoliques de la grenade sont des molécules polaires pour la majorité mais comportant des groupements apolaires ou impliqués dans des interactions intermoléculaires, et leur extraction nécessite un solvant capable de les dissoudre, comme l'eau, les alcools ou l'acétone [165]. El-Hadary et al. [166] ont par ailleurs montré une plus grande efficacité de l'eau, l'éthanol et le méthanol pour extraire les polyphénols des péricarpes par extraction au Soxhlet que l'éther diéthylique et l'acétate d'éthyle. Leur étude a montré que les teneurs en polyphénols totaux sont plus faibles dans les extraits obtenus à l'éther et à l'acétate d'éthyle (3,1 % et 6,5 %, respectivement) que dans les extraits obtenus à l'eau, à l'éthanol 80 % dans l'eau et au méthanol 80 % dans l'eau (8,1, 9,0 et 18,9 % g/g ms, respectivement). La majorité des études sur l'extraction des composés phénoliques ou actifs des péricarpes de grenades ont été menées avec ces trois solvants, et se sont attachées à évaluer l'influence du changement de la proportion eau/alcool avec [123,167] ou sans la présence d'acide [127,160,168–173] au moyen de plusieurs méthodes extractives.

Les rendements des extraits sont influencés par ces proportions, avec des valeurs plus élevées pour l'éthanol 75 % dans l'eau acidifiée (macération [167]), pour l'éthanol 50 % dans l'eau (macération [168]), et pour l'eau, l'éthanol 20 % dans l'eau et le méthanol (UAE, 40 °C [127]). Ces différences peuvent résulter des conditions opératoires, la macération et l'extraction assistée par ultrasons étant réalisées à différents ratios solide/liquide, durées et températures.

De plus, il a été démontré que le rendement d'extraction des co-produits de la grenade n'est pas nécessairement corrélé aux rendements en composés phénoliques, et que la teneur en polyphénols individuels varie en fonction du solvant. L'extraction au Soxhlet dans le méthanol à 80 % dans l'eau entraînerait une teneur en polyphénols totaux plus élevée [166] alors que dans d'autres études ce serait l'extraction par macération dans l'eau acidifiée ou non, ou l'éthanol pur, à 50% ou à 80% dans l'eau acidifiée (24 h, ratio s/l 1/10) [123,168] ou dans l'eau ou le méthanol (4 h, ratio s/l 1/25) [170] ou dans de l'éthanol (1 h, ratio s/l 1/30) [171], ou bien l'extraction assistée par ultrasons dans de l'éthanol 50 % dans l'eau (1 h, température ambiante) [169] ou dans de l'eau (température 50-100°C, ratio s/l 1/10) [160].

Aucune de ces études n'a employé les mêmes conditions opératoires en termes de méthode extractive, durée, ratio s/l, température, ce qui est à l'origine des variations de l'efficacité des solvants. Le solvant d'extraction des composés phénoliques de la grenade doit donc être choisi en fonction de tous les facteurs impliqués dans le processus, comme nous l'avons déjà dit, la taille des particules, le rapport solide/liquide, mais aussi la température d'extraction, la durée et les paramètres supplémentaires tels que les ultrasons et la pression.

#### 1.4.2.d. Température

La température d'extraction contrôle la diffusion et la solubilité des molécules dans le solvant d'extraction. Lorsque la température augmente, les composés peuvent théoriquement être extraits à des niveaux plus élevés. Cependant, certaines molécules sont altérées par la température qui favorise leur dégradation ou des réactions chimiques avec d'autres composés de la matrice et du solvant. En ce qui concerne les péricarpes de grenade, Brighenti et al. [142] ont montré que certains dérivés de l'acide ellagique seraient thermolabiles et, lors de l'extraction par macération à reflux pendant 1 h, seraient hydrolysés en acide ellagique. Étonnamment, Qu et al. [158] ont montré que la teneur en polyphénols totaux est multipliée par deux lorsque la macération aqueuse est effectuée à 95 °C (19,5 % eag/g ms) au lieu de 25 °C (11,5 % eag/g ms) lorsque l'équilibre d'extraction est atteint (1 et 2 min, respectivement). Malgré cette teneur en polyphénols totaux plus importante, l'activité antioxydante, mesurée par la rétention des radicaux libres du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), des extraits aqueux diminue avec l'augmentation de la température (5,9 % à 25 °C et 3,2 % à 95 °C), et reste stable pendant toute la durée de l'extraction (4 minutes). Une autre étude [160] sur l'extraction des composés phénoliques dans l'eau à des températures situées entre 50 et 100 °C pendant 30 min a montré que les rendements les plus faibles sont observés à 100 °C. L'augmentation de la température entraîne une augmentation du rendement de 50 à 70 °C puis une diminution de 70 à 100 °C. Des résultats similaires ont été obtenus par Kharchoufi et al. [161] pour l'extraction à l'eau : l'augmentation de la température de 55 à 75 °C entraîne une augmentation de 5 % du contenu phénolique total (de 274,1 à 286,6 mg eag/g d'extrait ms). Finalement, lorsque de l'éthanol est ajouté au milieu d'extraction à une proportion de 30 % la température n'a plus d'effet sur le rendement, et aux proportions de 50 et 70 % l'augmentation de la température de 90 à 100 °C ou de 70 à 100 °C diminue le rendement [160].

Des tendances différentes sont observées pour les rendements des composés phénoliques à des températures croissantes dans divers solvants d'extraction. Les



variations liées au solvant sont cohérentes avec les éléments décrits précédemment. La température modifie les propriétés du solvant et la solubilité des molécules ce qui explique les écarts avec les extractions faites à température ambiante ou plus faible. L'impact antagoniste de la température sur les rendements en polyphénols pourrait résulter des durées d'extraction variables (2 min à 1 h), et d'autres conditions opératoires impactantes comme le ratio s/l, la taille des particules. La capacité antioxydante des polyphénols des co-produits de grenade semble être affectée par la température d'extraction, donc pour éviter toute perte de bioactivité, l'extraction devrait être effectuée à des températures douces. De plus, l'augmentation des rendements peut être considérée comme une faible amélioration du procédé en tenant compte de la consommation énergétique liée à la chaleur. Enfin, Khatib et al. [172] ont montré que les polyphénols individuels (punicalagine, acide ellagique et ses dérivés) sont extraits à des niveaux plus élevés ou équivalents par l'eau à température ambiante pendant 24h ou à ébullition pendant 1 h. L'extraction des péricarpes de grenades avec une température élevée doit donc être réfléchiée en considérant le coût énergétique, les potentielles altérations des composés ou de leur activité et la diminution de la durée du procédé.

#### 1.4.2.e. Durée

La durée d'extraction est un paramètre important car lorsque la vitesse de diffusion des composés de la matrice vers le milieu est faible, l'extraction doit être effectuée plus longtemps pour obtenir les mêmes rendements. Néanmoins, son extension est limitée par l'atteinte de l'équilibre de diffusion des composés entre la matrice et le milieu, et par les altérations potentielles des composés liées à leur oxydation ou réaction avec le milieu.

Kazemi et al. [174] ont montré une augmentation du rendement en polyphénols de 2 à 10 min d'extraction, lors de l'UAE des péricarpes de grenades dans de l'éthanol à 70 % dans l'eau. Le rendement en extractibles, les teneurs en polyphénols individuels (punicalagine, acide ellagique et acide gallique) et l'activité antioxydante étaient également plus importants avec une durée d'extraction de 10 min. De la même manière, l'extraction à l'eau des composés phénoliques des péricarpes de grenades à haute température a montré que l'augmentation de la durée de l'extraction jusqu'à 40 min induit une augmentation du rendement [162]. En revanche, celui-ci diminue ensuite si l'extraction est prolongée. De plus, l'effet des autres paramètres, la température et le ratio solide/liquide, est dépendant de la durée d'extraction.

Globalement, une augmentation de la durée d'extraction est bénéfique pour augmenter le rendement en polyphénols des péricarpes de grenade, jusqu'à un certain point selon le procédé d'extraction. La durée optimale établie dans les études est de 30 minutes par UAE, 40 minutes par macération à haute température (100-130 °C) et 5 heures par macération à 50 °C.

#### 1.4.2.f. Pression

L'augmentation de la pression du milieu pendant l'extraction améliore la diffusion du solvant dans la matrice et entraîne la rupture des cellules. Par conséquent elle augmente l'efficacité de l'extraction. L'extraction à haute pression a été étudiée pour améliorer le rendement en composés phénoliques des péricarpes de la grenade.

Alexandre et al. [175] ont montré que le rendement total en composés phénoliques, à l'exclusion des anthocyanes, est principalement affecté par la proportion d'éthanol dans le milieu (0-80 % dans l'eau), et dans une moindre mesure par la pression (0-600 MPa). Les conditions optimales d'extraction ont été définies à une pression de 356 ou 600 MPa, et 32 ou 56 % d'éthanol dans l'eau, pendant 30 minutes. L'augmentation de la pression dans le milieu a amélioré faiblement le rendement d'extraction de 6 % et assez fortement la teneur en polyphénols totaux de 13 %. Une autre étude [176] sur l'extraction à haute pression dans l'eau avec addition d'enzymes a par ailleurs montré que la variation de la pression de 300 à 600 MPa n'a pas d'effet sur le rendement de l'extrait (de 39 à 41 % g/g). L'élévation de la pression augmente légèrement la teneur en polyphénols totaux (de 201 à 214 mg eag/g), les polyphénols individuels (isomère de punicalagine, isomère de bis-HHDP-glucoside, digalloylpentoside, acide ellagique-O-hexoside, acide ellagique, apigénine-O-hexoside), et l'activité antioxydante (de 322 à 346-338 mg équivalent Trolox/g).

L'effet de l'addition de pression lors de l'extraction est péricarpes de grenades dans l'eau à 40 °C a été aussi étudiée avec un autre système employant le diazote comme gaz d'expansion à l'intérieur de la cellule contenant l'échantillon [159]. L'augmentation de la pression initiale augmente le rendement en punicalagine et en acide ellagique jusqu'à 53 mg/g à 0,5 MPa, soit 10 % de plus qu'à pression atmosphérique. Les rendements en polyphénols diminuent ensuite (38 % de moins que le rendement maximal observé) par l'ajout de pression supplémentaire jusqu'à 1,5 MPa. L'augmentation de la pression globale du système a également été étudiée entre 10 MPa et 30 MPa, et entraîne des rendements en polyphénols individuels (punicalagine, acide ellagique) identiques ou inférieurs.

L'ajout d'un gaz d'expansion augmente la pression du mélange de solvants et modifie ainsi ses propriétés physiques, notamment sa densité et sa constante diélectrique. Il est cohérent qu'au-delà d'une certaine pression, son effet est contrebalancé par la densité élevée du milieu qui empêche la diffusion du solvant à travers l'échantillon. L'effet de la pression est aussi fortement lié au solvant utilisé pendant l'extraction, puisque chacun d'eux a ses propres propriétés physiques initiales. L'augmentation de la pression lors de l'extraction permet d'obtenir une teneur plus élevée en composés phénoliques totaux jusqu'à un certain point, mais la teneur de certains composés prédominants dans les péricarpes (punicalagine et acide ellagique) ne semble pas affectée.

#### 1.4.2.g. Ultrasons

L'extraction assistée par ultrasons (UAE) a aussi été étudiée dans le but d'extraire les polyphénols des péricarpes de grenade. Comme exposé précédemment, les ultrasons améliorent l'efficacité de l'extraction grâce aux bulles de cavitation créées par les impulsions, qui augmentent la pression et la température localement dans le milieu, et plus généralement en améliorent l'homogénéité. L'optimisation de l'UAE pour l'extraction des polyphénols des péricarpes de grenades implique la sélection d'une sonde ou d'un bain, et l'ajustement de la puissance (ou l'amplitude), de la durée des impulsions et du rapport d'intervalle, appelé aussi rapport cyclique, si le mode pulsé est sélectionné. Comme la température augmente localement, les effets de la température cités précédemment, notamment sur l'altération des polyphénols

thermolabiles, s'appliquent lors de l'UAE. Cette méthode a été largement étudiée et optimisée avec deux types de génération des ultrasons : par impulsions ou en mode continu.

Concernant l'UAE par impulsions, selon Kazemi et al. [174], l'intensité (53-105 W/cm<sup>2</sup>) et la puissance (50-90 %) affectent principalement le rendement d'extraction devant sa durée, dans de l'éthanol à 70 % dans l'eau. Le rendement augmente jusqu'à 42 % avec un niveau d'intensité de 53 à 64 W/cm<sup>2</sup>, puis diminue. En revanche, les teneurs en polyphénols totaux et individuels (punicalagine et acides gallique) et l'activité antioxydante sont affectées de manière significative par le niveau d'intensité des ultrasons et la durée d'extraction, tandis que seule cette dernière affecte la teneur en acide ellagique. Pan et al. [177] ont également étudié l'extraction par UAE, mais dans l'eau. Les changements de la durée d'impulsion, de l'intervalle d'impulsion et des niveaux d'intensité entraînent des variations des rendements en polyphénols mais une capacité antioxydante similaire des extraits. La valeur maximale de la teneur en polyphénols (14,5 % g équivalent acide tannique (eat)/g ms) est obtenue au niveau d'intensité maximal étudié, 59,2 W/cm<sup>2</sup>, avec une augmentation de 1 % entre 23,7 et 59,2 W/cm<sup>2</sup>. Un nombre d'impulsions de 360, et une durée d'intervalles de 9/1 s, 5/5 s, et 3/15 s produisent trois extraits avec une teneur en polyphénols totaux similaire (14,4-14,5 % g eat/g ms).

L'UAE en mode continu dans l'eau a aussi un effet sur les polyphénols extraits des péricarpes de grenade. Dans leur étude, Pan et al. [177] ont montré que les rendements en polyphénols sont principalement affectés par la puissance des ondes ultrasonores et la durée. Les valeurs les plus élevées (13,6-14,8 % g eat/g ms) sont obtenues à des niveaux d'intensité de 18,9 à 59,2 W/cm<sup>2</sup> pendant 60 à 90 min. En revanche, l'activité antioxydante, mesurée par la séquestration des radicaux DPPH, n'est pas significativement influencée par ce facteur. Ces résultats sont en accord par l'étude de Santos et al. [159], dans laquelle l'augmentation de la puissance des ondes ultrasonores de 0 à 400 W entraîne une augmentation de la teneur en polyphénols. L'augmentation supplémentaire de la puissance de 400 à 600 W ne permet pas d'améliorer leur rendement.

L'UAE, et notamment la puissance des ondes ultrasonores, en mode pulsé ou continu, semblent promouvoir l'extraction des composés phénoliques des péricarpes de grenade. Néanmoins, la puissance doit être choisie avec soin car, trop haute, elle peut favoriser la dégradation de certains composés par la dissociation de l'eau en radicaux libres qui peut promouvoir leur oxydation. De plus, la teneur en polyphénols totaux semble être corrélée avec l'intensité appliquée jusqu'à un certain niveau à partir duquel elle cesse d'augmenter. Les teneurs en composés phénoliques individuels (punicalagine, acide ellagique et acide gallique) semblent également en lien avec le niveau d'intensité des ultrasons, mais cette relation varie selon le mode continu ou pulsé. En ce qui concerne l'UAE en mode pulsé, les conclusions sur l'effet de la durée des impulsions et du ratio d'intervalle sont partagées. Dans l'eau, les ratios d'impulsions optimaux sont (9/1 s, 5/5 s, 3/15 s) pour la teneur en polyphénols totaux, alors que dans l'éthanol à 70 % dans l'eau, les cycles de 50, 70 et 90 % n'ont aucun effet sur le rendement en polyphénols. L'activité antioxydante n'est pas affectée par les paramètres d'extraction assistée par ultrasons, sauf pendant l'UAE pulsée dans

l'éthanol à 70 % où elle est maximale au niveau d'intensité le plus élevé étudié (105 W/cm<sup>2</sup>).

Dans l'ensemble, l'UAE peut améliorer l'extraction des composés phénoliques des péricarpes de grenades mais nécessite une vérification du maintien de la qualité de l'extrait, à la fois en termes de composition mais aussi d'activité biologique. Le paramètre le plus pertinent à optimiser semble être la puissance des ultrasons. Cette méthode permet d'augmenter la vitesse d'extraction des polyphénols, cependant l'extraction par macération jusqu'à épuisement peut conduire à des rendements en polyphénols similaires [160].

#### 1.4.2.h. Additifs

L'ajout d'additifs dans le milieu d'extraction a pour objectif de favoriser la solubilisation ou la stabilisation des composés d'intérêt, ou de détériorer les macromolécules qui retiennent les composés ciblés. Par exemple, l'extraction des protéines implique l'ajout de détergents ou de ligands pour les stabiliser, et l'extraction des polysaccharides emploie des tampons et des enzymes pour augmenter leur solubilisation. Pour d'autres métabolites tels que les polyphénols, des enzymes peuvent être employées pour dégrader la paroi cellulaire et améliorer leur extraction.

Lors de l'extraction assistée par ultrasons et enzymatique des péricarpes de grenade, l'ajout de cellulase a un impact positif sur les rendements en pectine et en composés phénoliques, atteignant 12 % dans les conditions optimales. Ce rendement est similaire à ceux obtenus par des méthodes plus conventionnelles, 11-12 % par macération à reflux ou en milieu acide. Cependant, à partir d'une certaine concentration enzymatique, une fraction des polyphénols précipite avec les pectines [162]. Pour améliorer ce procédé, l'immobilisation de la cellulase sur des nanoparticules magnétiques a été évaluée, et a conduit à des rendements d'extraction similaires et des extraits de composition équivalente [178]. L'intérêt de l'immobilisation de la cellulase est la diminution de la quantité d'enzyme nécessaire au procédé, en plus des avantages de conditions d'extraction douce en termes de potentiel hydrogène (pH = 6) et de température (50 °C). Des études plus approfondies devront évaluer la faisabilité et l'effet du transfert de cette méthode à une échelle industrielle, car ces résultats sont prometteurs. D'autres méthodes extractives décrites précédemment employant par exemple des solvants organiques ou des ultrasons montrent des rendements plus élevés, mais leur coût énergétique et environnemental pourrait être supérieur à celui de ce procédé.

#### 1.4.3. Conclusion

L'extraction des polyphénols et des lipides des co-produits de grenade a été beaucoup étudiée afin d'augmenter les rendements ou améliorer la sélectivité des méthodes. Des différences notables de l'effet de la méthode d'extraction sont retrouvées entre les études, rendant difficile la sélection de la plus efficace. D'autres nécessitent l'utilisation d'appareils spécifiques, les rendant moins accessibles et moins éprouvées. À l'inverse, les méthodes d'analyse des lipides et polyphénols sont très similaires entre les études. Pour les polyphénols, les principales méthodes sont l'évaluation de la teneur en polyphénols totaux par colorimétrie, et des teneurs en polyphénols individuels par

chromatographie liquide haute performance (CLHP). Pour les lipides, ils sont très largement analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

## 1.5. Paramètres influençant la composition chimique des co-produits de grenade

La composition chimique de la grenade a fait l'objet d'études approfondies au cours des deux dernières décennies, qui sont recensées dans des revues comme récemment par Ranjha et al. [52]. Les auteurs s'accordent sur la présence de minéraux, protéines, sucres, vitamines, acides organiques, acides gras, fibres, terpénoïdes, polyphénols et alcaloïdes. Leurs teneurs dépendent de la partie du fruit (graine, jus ou péricarpe) ainsi que des conditions de culture, mais aussi de la conservation et de la méthode de transformation du fruit. En particulier, les variations de la composition en lipides et polyphénols des co-produits de grenade peuvent résulter de nombreux paramètres précédant leur extraction qui peuvent être séparés en deux catégories, les facteurs pré-récolte et post-récolte. Les premiers sont liés à la culture du grenadier, c'est-à-dire à la variété de grenade, les conditions de culture, et le stade de maturité lors de la récolte. Les seconds concernent les procédés mis en œuvre entre la récolte des grenades et l'extraction des composés à valeur ajoutée des co-produits, comme la conservation des grenades, ou le conditionnement et la conservation des co-produits de grenade. Ces derniers éléments ont fait l'objet d'un article intitulé *Pomegranate by-product valorization from field to food : impact of storage and processing on by-product and their value added molecules*, soumis à publication dans le journal *Trends in Food Science and Technology* [14].

### 1.5.1. Facteurs pré-récolte

#### 1.5.1.a. Variété

Les variations de composition en composés bioactifs entre les variétés de grenade ont été établies depuis de nombreuses années. Ces études ont été motivées initialement par les différences morphologiques des grenades (figure 1.15) [179–181] et par les qualités organoleptiques des jus ou des graines [182,183]. Ensuite, la connaissance des propriétés nutritionnelles de la grenade et ses produits de transformation a incité la communauté scientifique à rechercher les variétés présentant les propriétés les plus fonctionnelles pour les consommateurs [66,108,180,181].



Figure 1.15 : Morphologie de 9 échantillons de grenade de 8 variétés cultivées dans plusieurs parcelles de la région d'Alicante, Espagne. Reproduit depuis l'étude de Fernandes et al. [184].

Au vu de son intérêt nutritionnel, l'huile de grenade a fait l'objet de nombreuses recherches en ce sens, du point de vue de sa teneur et sa qualité. Les variations de cette teneur entre plusieurs variétés de grenade ont aussi été évaluées, et, pour limiter les biais liés aux méthodes d'échantillonnage, d'extraction et d'analyse, seules ces études sont mentionnées ci-après. La teneur en huile des graines de grenades varie entre 7 et 19 % (g/g) entre 25 variétés cultivées en Iran [185], entre 6 et 22 % (g/g) entre 21 variétés cultivées en Tunisie et Chine [186], entre 16 et 18 % (g/g) pour 3 variétés

cultivées en Chine [187], entre 25 et 27 % pour 3 variétés cultivées en Inde [188], entre 4 et 14 % pour 8 variétés cultivées en Espagne [184], entre 5 et 27 % dans 13 variétés de grenade du sud de l'Italie [189]. Certaines variétés ont des teneurs proches, mais la majorité sont significativement différentes, comme démontré dans l'étude de Montefusco et al. [55] dans laquelle la teneur en huile de la partie interne de la graine de la variété Ako (26 % g/g masse humide) est supérieure à celles de trois autres variétés, qui ne sont pas différentes entre elles (17-18 % g/g masse humide).

La composition en acides gras de l'huile de grenade varie aussi selon la variété considérée. L'acide punicoïque est l'acide gras prédominant quelle que soit la variété considérée, et sa teneur relative aux acides gras totaux a été estimée entre 52,9 et 89,7 % [84,88,89,91,92,184,189–192]. La teneur en acide punicoïque de 20 variétés de grenades cultivées en Espagne varie de 3,0 à 7,5 % (g/g), et des différences significatives sont retrouvées pour tous les autres acides gras identifiés (acides palmitique, linoléique, oléique, stéarique, et arachidique, et isomères de l'acide punicoïque) [193]. Dans une autre étude sur 8 variétés cultivées dans la région Alicante d'Espagne, celle-ci varie de 3,5 à 10,6 % (g/g) et les autres acides gras identifiés aussi [184]. De la même manière, les teneurs en acide punicoïque et ses isomères, palmitique, stéarique, oléique et linoléique de la partie interne des graines varient significativement entre 4 variétés de grenades cultivées en Israël [55].

Les variations de la composition des parties comestibles de la grenade entre variétés ont conduit à explorer celles des parties non comestibles, les péricarpes. La teneur en polyphénols totaux des péricarpes de grenades est impactée fortement par la variété considérée et peut varier de 70 à 430 mg eag/g ms (mg équivalent acide gallique/g masse sèche) [59,86,112,123,125,127,194,195]. Par exemple, 4 variétés cultivées en Turquie ont une teneur en polyphénols totaux comprise entre 1,8 et 3,6 mg eag/g (masse humide) [196]. En revanche, des similarités ont aussi été démontrées, comme dans 4 variétés (Ako, Emek, Kamel et Wonderful One) cultivées en Israël pour lesquelles la teneur en polyphénols totaux est autour de 52- 61 mg eag/g (masse humide) [55]. Néanmoins, l'évaluation des teneurs en flavonoïdes totaux et anthocyanes totales a montré des variations significatives entre ces quatre variétés. Les flavonoïdes et anthocyanes étant des polyphénols, cela suggère que les teneurs de certains, minoritaires, pourraient être variables, alors que les teneurs d'autres, majoritaires, resteraient inchangées.

La quantification des polyphénols individuels extraits des péricarpes de grenades a montré des variations significatives entre 18 échantillons originaires d'Israël et d'Italie [142]. Des variations ont même été retrouvées à l'échelle des tissus composant le péricarpe. L'exocarpe, la partie la plus externe du péricarpe, contient entre 5,8 et 39,7 mg/g de punicalagine et entre 0,7 et 13,2 mg/g d'acide ellagique. Le mésocarpe, la partie située sous l'exocarpe, contient entre 10,9 et 30,0 mg/g de punicalagine et entre moins de 0,6 et 3,2 mg/g d'acide ellagique. Dans une autre étude portant sur 6 variétés chinoises cultivées dans deux régions de Chine [197], les différences maximales de teneur en punicalagine observées entre variétés cultivées dans la même région étaient de l'ordre de 96 mg/g pour la région Shandong et 15 mg/g pour la région Xinjiang. Pour l'acide ellagique, les différences maximales entre variétés étaient de l'ordre de 2,7 mg/g pour la région Shandong et 0,5 mg/g pour la région Xinjiang.

Ces différences de composition phénolique et lipidique entre les variétés de grenade résultent notamment de variations génotypiques, qui ont été établies récemment [198–201]. Cependant, les variations observées entre les études publiées peuvent aussi résulter d'autres facteurs liés aux pratiques culturales, qui seront développés ci-après.

#### 1.5.1.b. Conditions pédoclimatiques

L'effet des conditions pédoclimatiques de culture de grenade sur leur composition a souvent été évalué en parallèle de celui de la variété, puisque ces deux paramètres sont compris dans un système de culture.

Concernant les lipides présents dans les graines de grenade, leur teneur semblerait évoluer lorsqu'une même variété est cultivée sur plusieurs parcelles. La variété de grenade Sefri cultivée en Tunisie a un rendement en huile significativement différent entre les six parcelles de l'étude, et compris entre 21 et 25 % (g/g) [202]. Le profil d'acides gras varie aussi entre certaines zones de culture, avec des variations des acides gras majoritaires de 79,6 à 80,7 % pour l'acide punicoïque et de 5,3 à 6,3 % pour l'acide linoléique. La corrélation des teneurs en acides gras avec les conditions pédoclimatique a révélé que la teneur en acide punicoïque est liée à l'altitude des parcelles, mais indépendante des autres paramètres pris en compte comme la température, les précipitations, et l'ensoleillement. En revanche, la teneur en huile est similaire (7-9 %) dans la partie interne de la graine de la variété Wonderful cultivée dans deux parcelles de la même région d'Espagne (Alicante) [184] ou dans celles de la variété Gabsi de deux parcelles en Tunisie [186]. Des différences notables ont été observées dans le profil d'acides gras de Wonderful alors qu'aucune variation n'est observée pour la variété Gabsi. L'effet de traitements appliqués aux vergers de grenade sur la teneur en huile des graines a aussi été étudié. L'application foliaire de nutriments comme le zinc, le bore ou l'azote n'influenceraient pas notablement la teneur en huile de plusieurs variétés de grenade [188,203].

L'évaluation des variations en teneur en polyphénols des péricarpes de grenades liées aux conditions pédoclimatique a aussi été démontrée. Sans en approfondir l'origine, Sabraoui et al. [204] ont montré que la teneur en polyphénols totaux des péricarpes de la variété Sefri est similaire entre trois régions au Maroc, celles des acides ellagique et galliques très proches, mais ont observé des différences notables dans les teneurs en flavonoïdes et punicalagine. Hernandez et al. [205] ont décrit des variations dans toutes les teneurs en polyphénols évaluées (polyphénols totaux, anthocyanes et flavonoïdes) de la variété Wonderful cultivée dans deux régions du Mexique. Schwartz et al. [206] ont montré que les teneurs en polyphénols totaux, punicalagine, et punicaline varient significativement lorsque les grenades sont cultivées sous deux climats distincts, en employant 11 variétés. Ces variétés de grenades cultivées sous un climat désertique auraient des teneurs en polyphénols totaux plus élevées que celles produites dans un climat plus tempéré. Boussaa et al. [207] ont aussi montré une variation non négligeable de la teneur en polyphénols totaux des grenades de la variété Gabsi cultivées dans 3 régions de Tunisie. La corrélation de ces variations avec les conditions climatiques a révélé des liens avec la température, les précipitations, et l'humidité relative de chaque zone. Contrairement à l'étude de Schwartz et al. [206], les grenades cultivées dans des régions plus chaudes ont une teneur en polyphénols



totaux plus faible, alors que celles cultivées dans des zones plus humides ont une teneur en polyphénols totaux plus élevée. Ces conclusions opposées peuvent être expliquées par l'étude de variétés différentes et la prise en compte d'une quantité limitée de facteurs environnementaux. Des recherches sont en cours sur la compréhension des mécanismes à l'origine des variations des teneurs en polyphénols des péricarpes. Par exemple, Attanayake et al. [199] ont montré que les variations des teneurs en polyphénols totaux et punicalagine des péricarpes de grenades engendrée par les conditions agro-climatiques pourraient être liées à la régulation de l'expression de certains gènes.

### 1.5.1.c. Maturité des fruits

La maturité des fruits a une incidence largement connue sur la qualité organoleptique des fruits et légumes. Pour la grenade, la plupart des études se concentrent sur l'évolution des caractéristiques des parties comestibles du fruit ou le développement de méthodes non destructives pour déterminer leur maturité [208], notamment grâce au changement de couleur des fruits (figure 1.16). La teneur en huile des graines de grenades augmente avec la maturité des fruits, de 10-15 % à 25 % selon la variété considérée [188]. Du point de vue de sa qualité, l'huile de grenade de la variété Mollar aurait les teneurs en acides gras insaturés les plus importantes entre 80 et 90 jours après le début du développement du fruit [209]. Fawole et al. [57] et Munera et al. [210] ont recensé les évolutions des polyphénols et de l'activité antioxydante dans la grenade et le jus au cours du développement du fruit. Ces deux études sont en accord avec une diminution des teneurs en polyphénols totaux et de la capacité antioxydante pendant la maturation du fruit. Cette diminution pourrait être liée à la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse des polyphénols, notamment des anthocyanes et ellagitannins, comme montré par Qin et al. [198] et Harel-Beja et al. [201]. Il semblerait néanmoins que pour une même variété, les évolutions ne soient pas exactement identiques d'une année sur l'autre, et donc que les facteurs environnementaux soient aussi à prendre en compte.

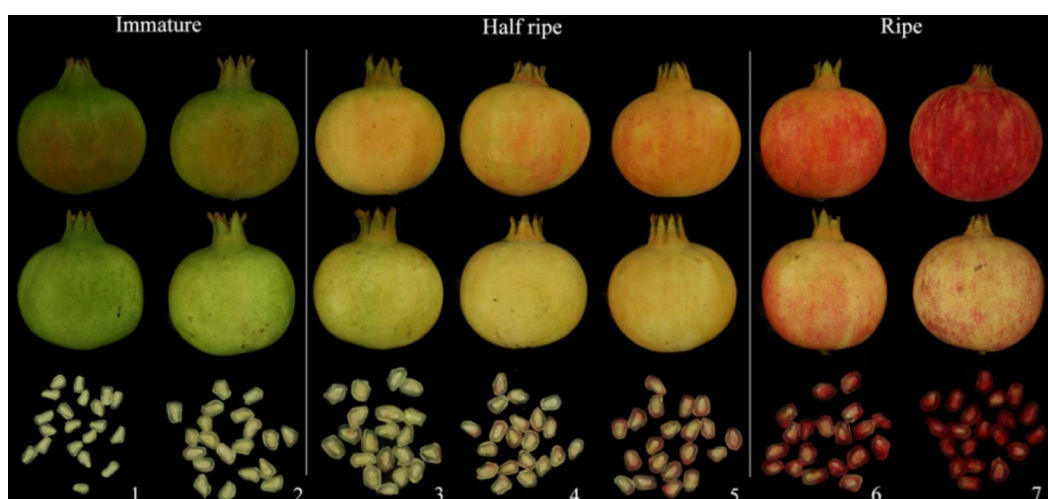


Figure 1.16 : Morphologie du fruit du grenadier (variété Mollar de Elche) au cours de son développement. Reproduit depuis l'étude de Munera et al. [210].

## 1.5.2. Facteurs post-récolte

Entre la récolte des grenades et l'extraction des co-produits de pressage, plusieurs procédés peuvent induire des variations de la composition moléculaire des co-produits de pressage. Les principaux sont relatifs à la conservation des grenades, leur transformation, et le conditionnement et la conservation des co-produits générés. Les effets de ces procédés sur les teneurs en polyphénols et lipides des co-produits de grenade seront exposés dans les parties suivantes. Néanmoins, à notre connaissance, l'impact des procédés de transformation des grenades a été évalué sur la composition du jus de grenade et non sur celle des co-produits de pressage. Plusieurs études ont en effet montré que les variations de pression lors du pressage des grenades semblent affecter les teneurs en polyphénols du jus [59,211], par conséquent, celles des co-produits de pressage des graines pourraient aussi varier. Compte-tenu de l'influence importante des facteurs pré-récolte sur ces teneurs, les informations présentées ont été sélectionnées pour limiter les biais liés aux variétés et aux conditions de culture des grenades.

### 1.5.2.a. Influence de la conservation sur la composition moléculaire

#### 1.5.2.a.i. Fruit

Les industries alimentaires et les autorités sanitaires sont attentives aux méthodes de conservation des aliments pour garantir des produits sains et maintenir leur qualité le plus longtemps possible. Selon la FAO, les fruits et légumes représentent 20 % (m/m) des pertes des denrées alimentaires entre la récolte et la distribution. Ces pertes seraient causées principalement par des méthodes de conservation inadéquates et une capacité de transformation inadaptée à la gestion des produits saisonniers. Pour limiter les premières, les principaux leviers seraient la durée, la température et l'humidité de conservation, ainsi que la limitation des impacts sur les fruits lors du transport et la conservation des denrées. Le solutionnement des problèmes d'emballage, de gestion des procédés, et la réduction de la taille ou du parage des denrées permettrait par ailleurs la diminution de pertes supplémentaires.

La conservation de la grenade a été bien étudiée ces dernières années pour augmenter sa durée, et surtout pallier les blessures liées aux basses températures (0-2 °C) sur les fruits, « *chilling injuries* » en anglais. Ces blessures se manifestent par le brunissement et le durcissement du péricarpe [212], ce qui rend la grenade moins attrayante pour les consommateurs [53]. De récentes recherches ont mis en évidence des paramètres de stockage retardant ces dommages post-récoltes, notamment la température, l'humidité relative (RH), la composition de l'atmosphère et les traitements. Pareek et al. ont rassemblé les recherches concernant ces points dans une revue [29]. Les caractéristiques qualitatives des grenades (masse, couleur, altérations d'origine microbienne ou physiologique, et altérations physiques de surface) sont maintenues dans leur ensemble par une température comprise entre 5 °C et 10 °C, une humidité relative (RH) entre 80 et plus de 92 %, dépendants de la variété considérée. La perte de masse des grenades serait liée à la présence de stomates [213] mais aussi de lenticelles et micro-craquelures à la surface des grenades [214]. Ces ruptures de la cuticule ou de l'intégrité de la couche superficielle de cellules des grenades seraient aussi en lien avec la présence de blessures liées au froid sur les grenades [212]. Le

brunissement de la peau en revanche serait plutôt lié à une cause enzymatique, avec la transformation des tannins et polyphénols par l'activité des enzymes polyphénol oxydase (PPO) et peroxydase (POD) [215].

Néanmoins, le développement de micro-organismes à la surface des grenades n'est pas limité par la conservation entre 5 et 10 °C et une humidité relative supérieure à 90 % ce qui peut entraîner des pertes lorsque la conservation s'étend sur plusieurs semaines. Plusieurs procédés visant à limiter toutes les altérations ont donc été développés, comme la conservation en atmosphère contrôlée (proportions de dioxygène et dioxyde de carbone principalement) et des traitements pré-conservation par immersion dans des solutions ou acclimatation à des températures intermédiaires. L'immersion dans des solutions de bicarbonate de sodium, de carbonate de sodium ou de sorbate de potassium a par exemple montré un intérêt pour réduire le développement de micro-organismes à la surface des grenades conservées à 7 °C. Un traitement par de l'eau chaude, des polyamines, de l'acide oxalique, ou des salicylates auraient aussi une incidence sur la susceptibilité des grenades à la conservation à basse température. Les études postérieures se sont attachées d'une part à évaluer les effets de différents traitements [216–218], de l'emballage [219–221] ou de l'enrobage [222] des grenades au cours de leur conservation, et d'autre part à déterminer l'origine des altérations liées aux basses températures [215]. Certains résultats ont également montré que la méthode de stockage affecte la composition chimique de la grenade, par exemple les polyphénols du fruit [217], des graines [216] ou des péricarpes [212,220]. Les effets principaux déductibles des études sur l'impact de la conservation des grenades sur les teneurs en polyphénols et acides gras sont représentés sur la figure 1.17.

La teneur en polyphénols totaux de la grenade fluctue pendant 6 mois de conservation (6 °C, 90 % RH) en atmosphère contrôlée de 3,2 à 4,4 g eag/kg, avec des augmentations et diminutions maximales de 39 % et 4 % par rapport à leur valeur initiale, respectivement [217]. Une tendance similaire est observée pour la teneur en polyphénols totaux du péricarpe de grenade, qui diminue de 2 400 à 1 600 mg eag/g d'extrait en masse sèche (ms) pendant la conservation des fruits jusqu'à 3 mois (7 °C, 92 % RH) après une légère augmentation de 8 % le premier mois (2 600 mg eag/g d'extrait ms) [220]. Dans une autre étude avec des paramètres de conservation comparables, la teneur en polyphénols totaux des péricarpes reste stable autour de 80 mg eag/g ms jusqu'à 3 mois, avec une légère augmentation après un mois de stockage [212].

La variation de la teneur en polyphénols totaux s'explique par les variations des teneurs en polyphénols individuels. L'identification et la quantification des polyphénols des péricarpes de grenades ont montré que la teneur en rutine a diminué (de 3 500 à 680 mg/kg), celle en catéchine est restée stable (650-750 mg/g) et celles en épicatechine, punicaline et hespéridine ont augmenté (de 60, 700 et 0,2 à 80, 780 et 14 mg/kg, respectivement) [220]. D'autre part, aucun changement significatif n'a été observé au cours du stockage pour les teneurs en acide gallique, glucose pentagalloyl, acide ellagique, punicaline et punicalagine, delphinidine, cyanidine et pélagonidine [212].

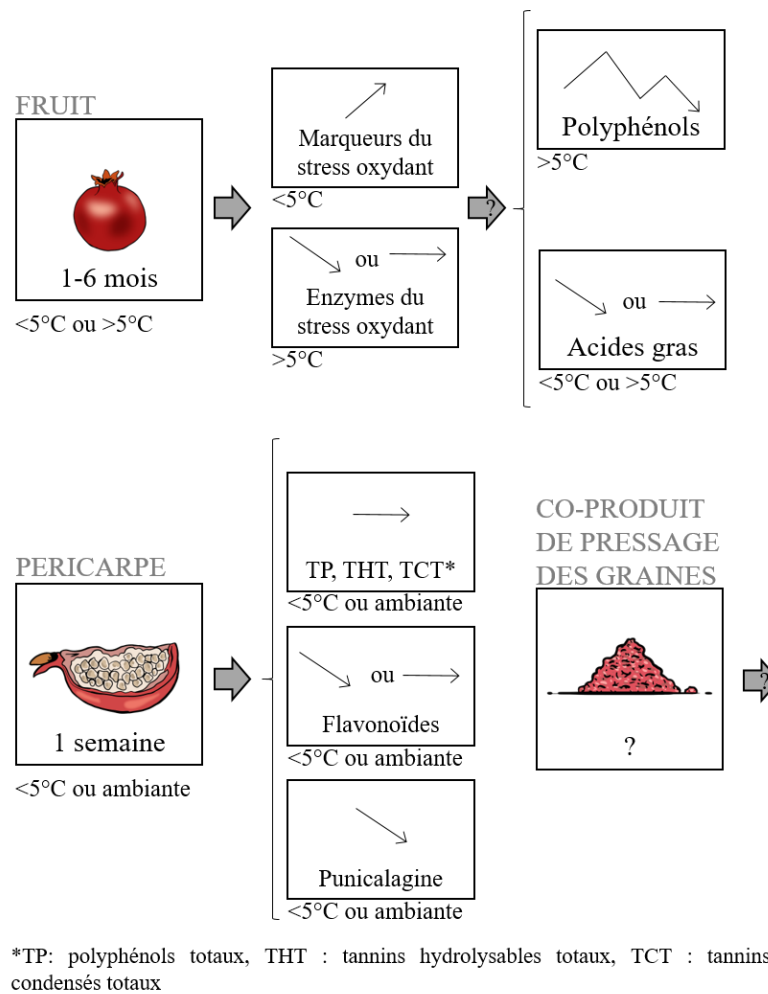


Figure 1.17 : Impact de la température de conservation des grenades et des co-produits sur les polyphénols et lipides. Reproduit depuis Lamotte et al. [14].

Ces variations des teneurs en polyphénols ont été suggérées comme en lien avec leur nature antioxydante et la protection des tissus contre le stress oxydant. Le suivi des teneurs des marqueurs biologiques du stress oxydant a en effet montré leurs augmentations dans les péricarpes pendant le stockage des fruits à basse température ( $2^{\circ}\text{C}$ , 160 jours) [219]. De plus, la régulation de l'expression des enzymes impliquées dans le stress oxydant semble être en lien avec la conservation des grenades, avec une répression pour la plupart d'entre elles à l'exception de celles de la glutathion réductase et de la polyphénol oxydase, dont l'expression reste inchangée [212]. Les fluctuations hétérogènes des teneurs en polyphénols totaux des péricarpes de grenades pendant le stockage des fruits pourraient être dues à deux effets antagonistes se produisant en réponse au stress oxydant. Ce stress pourrait déclencher à la fois la synthèse des polyphénols et la biosynthèse des polyphénols oxydases et des peroxydases. Le suivi de l'expression de ces enzymes pendant la conservation à basse température pourrait aider à comprendre les variations des polyphénols du péricarpe pendant le stockage de la grenade. Des recherches récentes ont également mis en évidence l'importance de la maturité des fruits à la récolte sur la composition moléculaire, l'activité antioxydante et l'expression des gènes liés aux enzymes antioxydantes [212], ce qui pourrait aussi expliquer la diversité des résultats obtenus.

En ce qui concerne les lipides des co-produits de pressage des graines, leur profil en acides gras ne varie pas significativement après la conservation des grenades de 1 à 3 mois à 7 °C et 92 % RH. Les teneurs relatives en acides palmitique, stéarique, arachidique, linoléique, punique et oléique varient entre 2,4 et 4,7 %, 1,3 et 3,7 %, 0,4 et 0,5 %, 2,0 et 4,7 %, 63,7 et 70,0 %, et 1,6 et 3,9 %, respectivement [220]. Des variations significatives apparaissent cependant lorsque les grenades sont placées à 2 °C pendant 3 mois. Des diminutions des teneurs en acides gras saturés et insaturés ont été observées, de 10 à 4 mg/100g de masse humide (mh) et de 15 à 7 mg/100g mh, respectivement. La conservation à 10 °C réduit la perte des deux types d'acides gras, avec des teneurs de 10 à 8 mg/100g mh pour les acides gras saturés et d'environ 17 mg/100g mh pour les acides gras insaturés [218]. Une faible température de conservation des grenades semble altérer la composition en acides gras des graines de grenade, tandis qu'une température de 7 °C ou plus semble la maintenir.

Ces évolutions du profil lipidique des graines de grenades avec la température pourraient être liées à l'apparition de blessures dues au froid (« *chilling injuries* ») lorsque les grenades sont conservées à 2 °C ou moins. En effet, Kashash et al. [223] ont mis en évidence un lien entre les variations de l'expression des gènes liés au métabolisme des lipides dans les variétés Ganesh et Wonderful conservées à 1 °C et la présence de blessures liées au froid lors de leur conservation à 5 °C. Dans la première variété, sensible à la conservation réfrigérée, ces variations sont limitées, alors que la seconde, plus tolérante au froid, montre d'importantes variations dont la surexpression des gènes liés à la synthèse des acides gras et triglycérides, et la répression de ceux impliqués dans leur dégradation. Ces éléments suggèrent que la conservation des grenades, et notamment la température, pourrait influencer la composition lipidique des grenades. Ces variations résulteraient de l'implication des lipides dans la flexibilité des membranes cellulaires, mais aussi dans la gestion des stress abiotiques [78,224,225].

La méthode de conservation des grenades aurait par conséquent un effet sur leur composition chimique. Les conditions de conservation optimales pour maintenir les caractéristiques qualitatives des fruits sont une température comprise entre 5 et 10 °C et une humidité relative entre 80 et supérieure à 90 %, et certains traitements thermiques ou d'immersion avant leur conservation. Ces paramètres peuvent cependant conduire, selon les variétés, à des altérations physiologiques et physiques, des développements de micro-organisme, et une modification de la composition chimique. Les conditions de conservation des grenades doivent donc être sélectionnées avec soin selon la variété de grenade considérée et en considérant la destination des grenades. En effet, la commercialisation en fruit frais implique une qualité différente de celle nécessaire pour la transformation en jus.

### 1.5.2.a.ii. Co-produits de transformation

Les modifications des teneurs en composés à valeur ajoutée des co-produits de grenade liées à leur conservation ne sont pas autant décrites que celles liées à la conservation des fruits entiers. Néanmoins les conditions de conservation des denrées alimentaires peuvent leur être transposées puisqu'ils contiennent un haut taux d'humidité, des glucides, des lipides et des nutriments permettant la croissance des micro-organismes et des métabolites potentiellement dégradables.

En ce qui concerne les péricarpes de grenades (figure 1.17), leurs teneurs en polyphénols totaux et en composés antioxydants ne sont pas affectées par la conservation à basse température (4 °C) ou ambiante (22-25 °C) à court terme (1 semaine), les teneurs restant autour de 130 mg eag/g ms et 40 µM d'équivalent Trolox/g ms et proches de celles des péricarpes non conservés. De même, les teneurs en tannins hydrolysables et condensés totaux restent stables autour de 2-3 mg eag/g ms et 50-100 mg d'équivalent (+)catéchine ec/g ms, respectivement. Cependant, la teneur en flavonoïdes totaux diminue de 30 % pendant la conservation à basse température (25 mg ec/g ms) par rapport aux co-produits conservés une semaine à température ambiante et non conservés (35 mg ec/g ms). La teneur en punicalagine diminue elle aussi pendant la conservation à 4 °C ainsi qu'à température ambiante, passant de 4 % dans les co-produits non conservés à 2 % (g/g ms) dans les co-produits conservés [226].

Cette étude a montré la présence de composés sensibles au froid (flavonoïdes) et/ou au stockage (flavonoïdes, punicalagine) dans les péricarpes de grenade. Les valeurs apparemment stables des teneurs en polyphénols totaux, en tannins hydrolysables et en tannins condensés pourraient néanmoins masquer des fluctuations des polyphénols individuels, puisque la teneur en punicalagine diminue. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes à l'origine des variations des teneurs en polyphénols des péricarpes. À notre connaissance aucune étude n'a évalué l'effet de la conservation des co-produits de pressage des graines de grenades sur leur profil lipidique. Des études sur l'influence de la conservation des co-produits de transformation des grenades sur leur composition chimique restent donc encore à effectuer.

#### **1.5.2.b. Impact du conditionnement des co-produits sur leur composition moléculaire**

L'altération des denrées alimentaires et produits affiliés peut être due notamment à la dégradation spontanée des composés organiques, à la présence d'animaux et d'insectes, ou à la croissance de micro-organismes [227]. Les réactions spontanées des composés d'une matrice peuvent être réduites par la conservation à basse température, qui diminue également les fonctions cellulaires [227]. Ces phénomènes peuvent avoir des effets synergiques ou antagonistes sur les teneurs en composés, comme décrit précédemment pour les polyphénols des péricarpes de grenades lors de leur conservation.

Pour éviter la contamination par les parasites et le développement des micro-organismes, l'accès à la matrice peut être limité par des emballages hermétiques et la stérilisation [227]. Le lavage peut aussi être envisagé, mais il a des effets secondaires potentiellement néfastes comme la solubilisation des composés ciblés dans la solution de nettoyage. Dans le cas des péricarpes de grenade, le lavage avec une solution hydroalcoolique (éthanol/eau, 70:30 v/v) entraîne une diminution du rendement en polysaccharides de 0,6 % (de 7,8 à 7,2 g/g de poids sec ms) [119]. La congélation, la conservation à une température proche de 0 °C, le séchage et, dans certains cas, les composés antimicrobiens endogènes préviennent généralement le développement de micro-organismes [227]. Étant donné que la congélation et la conservation à une

température proche de 0 °C ont un impact négatif sur la conservation des grenades, une tendance similaire pourrait être observée pour ses co-produits.

Le séchage des co-produits pourrait donc être une solution adéquate pour garantir leur qualité en termes de stabilité de composition moléculaire au cours de leur conservation. D'autres méthodes de conditionnement pourraient aussi être envisagées comme l'ensilage, qui permet traditionnellement aux agriculteurs de conserver leurs fourrages pendant l'hiver, ou d'autres traitements de la matière pour en améliorer l'extraction des composés à valeur ajoutée. Les effets de plusieurs procédés de conditionnement sont détaillés ci-après et sont présentés sur le tableau 1.2.

Tableau 1.2 : Impact du conditionnement des co-produits de grenade sur leur composition chimique. Reproduit depuis Lamotte et al.[14]. P : péricarpes, CG : co-produit de pressage des graines.

Procédé	Co-produit	Effet sur la composition chimique	Référence
Lavage (éthanol/eau 70:30 v/v)	P	Diminution du rendement en polysaccharides	[119]
Lyophilisation	P	Diminution des teneurs en polyphénols totaux, punicalagine, acide ellagique et de l'activité antioxydante (par comparaison avec la matière fraîche)	[228]
Etuve ( $\leq 40^{\circ}\text{C}$ )	P	Différence de couleur significative	[158,226, 228–232]
		Teneur en polyphénols totaux et activité antioxydante plus faibles ou similaires	
Diminution des teneurs en flavonoïdes totaux, tannins totaux et polyphénols			
Diminution de l'activité anti-microbienne			
Etuve ( $\geq 50^{\circ}\text{C}$ )	P	Différence de couleur significative	
		Diminution des teneurs en flavonoïdes totaux, tannins totaux et polyphénols	
	CG	Augmentation de la teneur en punicaline	
		Diminution des activités antioxydante et anti-microbienne	
		Diminution de la teneur en polyphénols totaux et de l'activité antioxydante (par comparaison avec la matière fraîche)	[69]
		Profil en acide gras similaire à la matière fraîche	
Séchage sous vide au micro-ondes (175-485 W, 4-20 kPa)	P et CG	Diminution de la teneur en polyphénols totaux avec l'augmentation de la puissance des micro-ondes	[69,228, 233]
	CG	Diminution de la teneur en polyphénols totaux et de l'activité antioxydante (par comparaison avec la matière fraîche)	
		Profil en acide gras similaire.	[69]
Séchage par Détente Instantanée Contrôlée (DIC)	P	Augmentation des teneurs en polyphénols totaux et en tannins totaux	[234]
Séchage en tambour rotatif (100-120°C)	P	Différence de couleur par comparaison avec la matière fraîche	[195]
		Teneurs en polyphénols totaux et en tannins totaux, et activité antioxydante similaires à la matière fraîche en dessous de 110°C, plus faibles au-delà de 110°C	
Ensilage (60 jours)	P et CG	Augmentation de la teneur en lipides totaux	[226,235,236]
		Teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins hydrolysables, et activité antioxydante similaires	
		Diminution de la teneur en punicalagine	

### 1.5.2.b.i. Séchage

Le séchage repose sur la déshydratation de la matière par élimination de l'eau, ce qui entraîne une diminution de la teneur et de l'activité de l'eau ( $a_w$ ) ainsi que des réactions concomitantes [237]. Cette méthode est courante pour stabiliser les produits dans le secteur alimentaire car, comme précisé précédemment, elle limite le développement de micro-organismes et les réactions biochimiques dans la matière [227]. Le taux d'humidité ciblé pour limiter le développement de micro-organismes est généralement de moins de 20 %, mais est à adapter à la composition chimique de la matière. En effet, selon l'activité de l'eau présente dans la matière, de nombreuses réactions chimiques peuvent se produire comme des oxydations, des hydrolyses ou des réactions de Maillard [237], comme présenté sur la figure 1.18. La déshydratation est souvent conduite pour réduire les coûts de transport ou pour adapter une matière à un procédé. Elle peut être réalisée par un large éventail de techniques basées sur la vaporisation ou la sublimation de l'eau, induites notamment par des changements de température, de pression, de vélocité et de composition de l'air, et de diffusion de l'eau dans la matière [238].

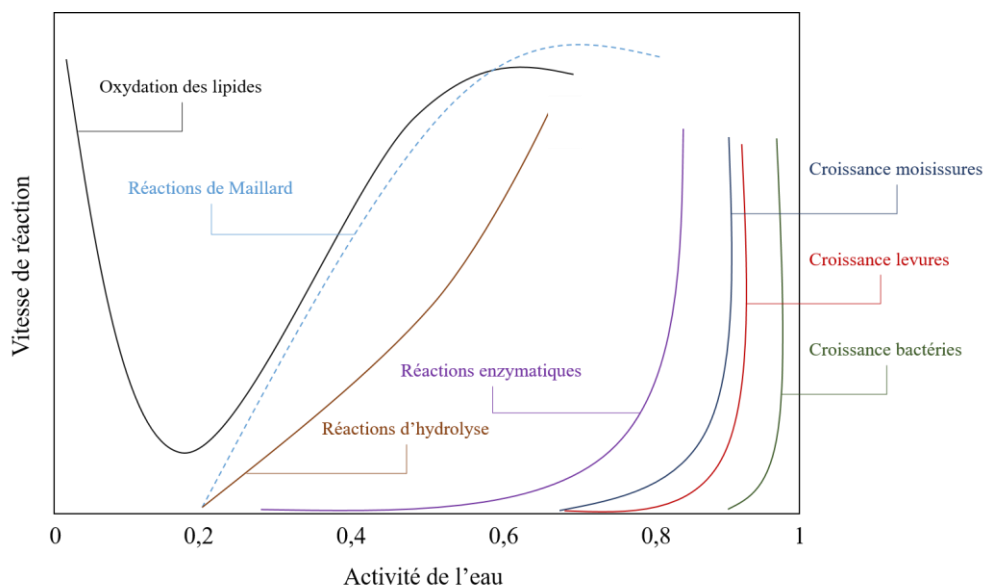


Figure 1.18 : **Diagramme de stabilité de la matière organique avec l'activité de l'eau.** Reproduit de Bonazzi et al. [237].

La méthode de séchage est choisie en tenant compte du maintien de la qualité du produit, de la durée et du coût du processus [237]. Parmi les techniques existantes, la lyophilisation déshydrate la matière par sublimation de l'eau à des températures allant de  $-80$  à  $-20$  °C sous pression réduite. Cette méthode est considérée comme le moyen le plus doux d'assurer à la fois la déshydratation et le maintien des composés dans la matière, principalement parce qu'elle implique de basses températures. Cependant la lyophilisation présente également certaines limites. L'une des principales est le coût du procédé, qui impacte son utilisation dans le secteur alimentaire par rapport à d'autres méthodes telles que le séchage à l'étuve. Une autre limite est l'augmentation de la porosité du matériau, qui peut conduire à des taux de réaction d'oxydation plus élevés et à la dégradation de composés sensibles [237]. Dans le cas de la déshydratation



des co-produits de grenade, les co-produits frais ou lyophilisés sont considérés comme témoins d'une récupération optimale des composés bioactifs dans la plupart des études. Néanmoins des diminutions de la teneur en polyphénols totaux de 6 %, de l' $\alpha$ -punicalagine de 19 %, de la  $\beta$ -punicalagine de 31 % et de l'acide ellagique de 31 %, ainsi que de l'activité antioxydante de 42 % ont été soulignées par Calin-Sanchez et al. [228] par rapport aux co-produits frais.

Le séchage à l'étuve des péricarpes de grenades à 40 °C pour atteindre un taux de matière sèche supérieur à 80 % n'affecte ni la teneur en polyphénols totaux (100 mg eag/g de matière ms), ni l'activité antioxydante (6 g/g ms) qui restent similaires à celles de la matière fraîche [158]. En revanche l'augmentation de la température à 60 °C entraîne une diminution de la teneur en polyphénols, avec des teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes totaux et en tannins hydrolysables inférieures à celles de la matière fraîche, et en particulier une diminution de la punicalagine de 2 % (g/g ms) [226].

Par comparaison à la lyophilisation, le séchage à l'étuve de 40 à 60 °C induit une différence de couleur significative et une réduction des teneurs en polyphénols, en tannins et en flavonoïdes des péricarpes de grenades [229,232]. La teneur en polyphénols (rutine, catéchine, épicatechine, hespéridine) diminue dans l'ensemble, à l'exception de la teneur en punicaline qui est augmentée de manière significative par le séchage à 60 °C [232].

Des résultats similaires sont obtenus en comparant le séchage des péricarpes à 50 °C avec le séchage à température ambiante et la lyophilisation. Les co-produits séchés à l'étuve contiennent une quantité plus faible d'ellagitannins, y compris la punicalagine, la punicaline et l'acide ellagique, par rapport à la matière lyophilisée, et une teneur en polyphénols totaux diminuée de 15 % [228,230]. Au total, 29 polyphénols ont été quantifiés dans les péricarpes, et les résultats montrent une différence marquée entre les échantillons séchés à 50 °C et ceux séchés à température ambiante et lyophilisés [230]. L'activité antioxydante des extraits de péricarpes de grenades est aussi diminuée par le séchage à 60 °C, passant de 590 à 355  $\mu\text{mol Trolox/g}$  par mesure de la séquestration des radicaux DPPH, par rapport à la lyophilisation [231]. Le séchage à 50 °C et à température ambiante réduit également l'activité antioxydante d'extraits de péricarpes par rapport à la lyophilisation [230].

L'étude de la déshydratation des péricarpes de grenades à l'étuve ventilée (vitesse de l'air 1-2 m/s, épaisseur 0,5-2,8 cm, teneur en humidité initiale 63-70 %) révèle une augmentation de la vitesse de séchage avec la température. L'équilibre de séchage est atteint à 22, 10-17, 5-12, 4-8 et 3 h à 40, 50, 60, 70 et 80 °C, respectivement, selon les paramètres de séchage. Les courbes cinétiques ont été ajustées avec le modèle de Midilli et al. [239], montrant un coefficient de diffusion de 4 à  $81.10^{-9}$   $\text{m}^2/\text{s}$  et une énergie d'activation de 13 à 40 kJ/mol, selon les paramètres de séchage [240–242].

En ce qui concerne les co-produits de pressage des graines de grenade, l'augmentation de la température de 50 à 70 °C en étuve ventilée diminue la teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante, alors que le profil d'acides gras reste stable sur toute la gamme de température, par rapport au co-produit frais. Le séchage des co-produits de pressage des graines de grenades de 50 à 70 °C affecte donc négativement leur teneur en polyphénols mais ne semble pas impacter les lipides. La cinétique de séchage

a montré une durée de séchage de 6 à 3 h lorsque la température augmente de 50 à 70 °C, inférieure à celle nécessaire pour sécher les péricarpes [69]. Ces différences pourraient être dues au taux d'humidité initial, à l'épaisseur et à l'équipement utilisé. Néanmoins, le séchage à l'étuve à basse température des co-produits de grenade, et en particulier des péricarpes, nécessite *a minima* plusieurs heures pour atteindre un taux de matière sèche compatible avec la conservation longue durée. D'autres méthodes de séchage ont donc été considérées pour réduire les coûts énergétiques et préserver les composés bioactifs des co-produits de grenade.

Parmi celles-ci, le séchage sous vide par micro-ondes (VMD, 240-480W, 4-6 kPa) des péricarpes de grenades a montré qu'une augmentation de la puissance induit une diminution de la teneur en polyphénols, par comparaison à la matière fraîche. Les teneurs en polyphénols totaux, punicalagine, et acide ellagique sont cependant plus élevées lors du séchage à une puissance de 240 W que lors du séchage à l'étuve à 50 °C [228]. La condition la plus douce (240 W) serait donc plus pertinente afin de préserver les teneurs en polyphénols des péricarpes de grenades. De plus, le séchage sous vide par micro-ondes n'affecte pas le profil d'acides gras des co-produits de pressage des graines, et l'acide punicique reste l'acide gras majoritaire à hauteur de 66 à 68 % des acides gras totaux. La teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante des co-produits de pressage des graines diminuent avec ce procédé comme cela a été rapporté pour les péricarpes de grenades [69].

Une évaluation plus approfondie de l'effet du séchage sous vide par micro-ondes (175-485 W, 10-20 kPa) a aussi été effectuée avec la détermination des variations des teneurs en polyphénols, de l'activité antioxydante, et des teneurs en minéraux et en acides aminés du péricarpe de grenade. Les teneurs de tous les composés étudiés diminuent après séchage, par rapport à la matière avant conditionnement. Les teneurs les plus élevées en polyphénols, flavonoïdes et tannins hydrolysables sont obtenues dans des conditions optimisées de 10 kPa et 276 W, pour une durée de moins de 15 minutes [233].

Deux autres méthodes originales de déshydratation ont été rapportées pour préserver ou améliorer la teneur en composés bioactifs des péricarpes de grenades : la Détente Instantanée Contrôlée (DIC) [234] et le séchage en tambour rotatif [195].

La DIC est un traitement hydro-thermo-mécanique permettant à la fois de sécher, décontaminer et déstructurer la matière. Le séchage par DIC a permis d'augmenter les teneurs en polyphénols et tannins totaux des péricarpes de grenades de 232 à 232-299 mg eag/g ms et de 435 à 491-560 mg d'équivalent d'acide tannique (eat)/g ms, respectivement, selon les paramètres du procédé [234].

Le séchage par tambour rotatif consiste à insérer la matière entre deux cylindres chauffés par de la vapeur d'eau. Les péricarpes de grenades soumis à ce procédé à une température comprise entre 100 et 120 °C et une durée maximale de 422 s à 100 °C, 400 s à 110 °C et 257 s à 120 °C montrent un changement de couleur de 3 à 4 (unités arbitraires), correspondant à une variation moins importante que le séchage à l'étuve. La teneur en polyphénols totaux des péricarpes reste stable (104-108 mg eag/g ms), mais les teneurs en tannins hydrolysables diminuent à une température supérieure à 110 °C (306 à 224 mg eat/g ms) et l'activité antioxydante reste également stable (881-952 mmol d'équivalent Trolox/g ms). La modélisation de la cinétique de

séchage a donné lieu à un ajustement avec la deuxième loi de Fick (énergie d'activation de 40,5 kJ/mol), ce qui diffère du séchage par étuve ventilée [195].

La méthode de séchage et les paramètres associés (durée, température, taux d'humidité final) doivent donc être choisis avec soin pour préserver les qualités des co-produits de grenades, car les composés bioactifs peuvent être détériorés ou transformés. En particulier, les composés phénoliques de la grenade semblent sensibles à la chaleur et la température pourrait donc être l'un des facteurs les plus importants à prendre en compte. Malgré les températures élevées utilisées dans le séchage par tambour rotatif, la courte durée du processus semblerait prévenir la dégradation des molécules, mais les teneurs en polyphénols individuels doivent encore être évaluées. Brighenti et al. [142] ont montré une thermosensibilité de certains ellagitannins (dérivés de l'acide ellagique tels que la punicalagine) pendant une macération des péricarpes aqueuse à reflux. Ces composés semblent avoir été hydrolysés en acide ellagique. Le même phénomène a été démontré lors de l'évaluation de la thermolabilité de la punicalagine purifiée, avec des pertes de 8,6 % à 80 °C pendant 1 h dans l'eau [243].

Dans les péricarpes de grenades, la matrice pourrait protéger la punicalagine et plus largement les ellagitannins de la dégradation, mais des températures et des durées de séchage élevées pourraient entraîner une baisse de leurs teneurs. Les polyphénols des co-produits de pressage des graines semblent affectés de la même manière alors que le profil d'acides gras semble rester similaire même après une augmentation de la température de séchage. En effet, des études de stabilité thermique et oxydative de l'huile de grenade ont montré que l'acide punicique sous forme de triglycéride n'est pas dégradé jusqu'à 170 °C pendant 4 h, mais son isomérisation commence à partir de 90 °C [92]. Des recherches complémentaires sur l'évolution de la teneur en triglycérides et des isomères des acides gras dans les graines de grenades doivent être menées.

### 1.5.2.b.ii. Ensilage

Une méthode moins coûteuse et largement utilisée par les agriculteurs pour conserver les fourrages est l'ensilage [244]. Cette technique met en jeu une fermentation anaérobie et une acidification de la matrice sous l'action des micro-organismes anaérobies se développant à la suite du compactage de la matière dans un milieu hermétique [245]. L'ensilage peut faciliter l'extraction des composés d'intérêt, comme la pectine de la betterave [246], ou préserver certaines molécules, comme les polyphénols et terpènes de co-produits d'artichauts [247]. L'évolution de la composition moléculaire est attribuée à la dégradation des parois cellulaires de la matière ensilée [244] mais aussi à l'action du microbiote [247]. Les familles de micro-organismes sont principalement des bactéries lactiques, des entérobactéries, des levures et des moisissures en mélange complexe et évolutif (figure 1.19) qui entraîne dans certains cas des difficultés d'identification de leurs membres [248,249].

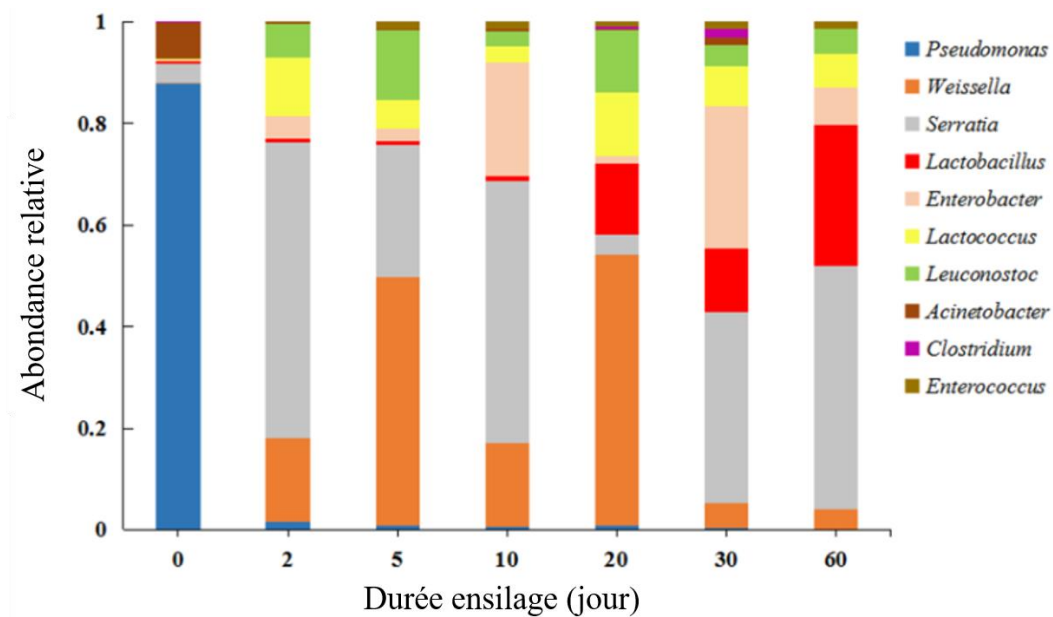


Figure 1.19 : Évolution de l'abondance relative des populations bactériennes au cours de l'ensilage des co-produits d'artichauts. Reproduit depuis Fan et al. [247].

Lors de l'ensilage, la fermentation est spontanée avec les micro-organismes présents initialement dans la matière, mais son effet pourrait aussi être reproduit par la fermentation *in vitro* en inoculant les micro-organismes autochtones [247]. Pour des raisons de sécurité alimentaire notamment, l'inoculation d'une seule souche isolée est proposée dans de nombreux travaux [248,250], bien qu'une étude récente ait montré une certaine robustesse de la fermentation spontanée et le développement de micro-organismes pathogènes induits plutôt par la rupture des conditions anaérobies [251]. La fermentation contrôlée a en effet montré que l'inoculum devient prédominant dans le milieu très rapidement [248], et empêche le développement de micro-organismes concurrents potentiellement pathogènes [250]. La fermentation avec inoculation de bactéries lactiques (30 jours, 4 °C) du jus de grenade diminue la teneur en polyphénols totaux et augmente celle en acide ellagique [252]. La présence de polyphénols et d'acide ellagique à la fois dans le jus et les péricarpes de grenades suggère que l'effet de la fermentation contrôlée pourrait être en partie similaire entre les deux parties du fruit.

Néanmoins, l'ensilage des co-produits des grenades pressées entières, donc comprenant les péricarpes et co-produits de graines pressées, ne semble pas affecter la teneur en polyphénols totaux solubles dans l'eau (27 % g d'équivalent quercétine/g) [236]. Des résultats similaires ont été observés après la fermentation spontanée des péricarpes seuls, avec des teneurs en polyphénols et flavonoïdes, ainsi qu'une capacité antioxydante similaires à celles des co-produits frais. Cependant, les teneurs en tannins hydrolysables et condensés ont été multipliées par deux, et celle en punicalagine divisée par deux par le procédé [226]. La diminution de la teneur en punicalagine pourrait être expliquée par plusieurs facteurs, dont l'acidification du milieu. En effet, lors de l'ensilage des co-produits de grenade, la teneur en acides organiques augmente en raison du métabolisme anaérobie des souches bactériennes [235]. Or, la dégradation de la punicalagine a été démontrée par

l'extraction à l'eau acidifiée ou non des composés phénoliques de péricarpes de grenades. L'extrait aqueux acidifié, comparé à l'extrait aqueux à pH neutre, contient 30 % de punicalagine en moins (45 et 65 mg/g ms, respectivement) et deux fois plus d'acide ellagique (25 et 13 mg/g ms, respectivement), ce qui peut être expliqué par l'hydrolyse de la punicalagine en acide ellagique [162]. D'autres essais ont par ailleurs montré que la punicalagine reste stable entre pH 3 et 9 [243]. La diminution de la teneur en punicalagine au cours de l'ensilage pourrait donc résulter d'un pH plus faible.

Concernant les composés lipidiques, l'ensilage pendant 60 jours des co-produits de grenades pressées entières augmente la teneur en lipides totaux de 63 à 76 mg/g [235]. Bien que cette augmentation de 20 % de la teneur en lipides puisse permettre à la fermentation spontanée d'être un procédé pertinent pour l'extraction des lipides, il serait intéressant de connaître le profil lipidique. En effet, l'ensilage du maïs a un effet délétère sur la teneur en acides gras qui semblent s'oxyder pendant le procédé, puisque les teneurs relatives en acides gras saturés augmentent et celles en acides gras insaturés diminuent proportionnellement. Les teneurs relatives de ces derniers diminuent au total de 1 à 8 % mais ce phénomène est retardé par l'ajout d'antioxydants au milieu [253]. L'ensilage des co-produits de pressage des graines de grenades pourrait par conséquent modifier leur profil lipidique en diminuant les teneurs en acides gras insaturés, dont fait partie l'acide punique. Cependant, les membranes et la pulpe des graines résiduelles, riches en polyphénols, pourraient protéger les acides gras de l'oxydation.

D'autres recherches devraient donc être menées sur la population bactérienne, les composés phénoliques de péricarpes et la composition en acides gras des co-produits de pressage des graines pour évaluer le potentiel de l'ensilage comme méthode de conditionnement des co-produits de la grenade.

### **1.5.2.b.iii. Prétraitements pour l'extraction des polyphénols et lipides**

Les prétraitements des co-produits de l'industrie agroalimentaire ont pour objectif notamment d'améliorer la qualité ou l'extraction de composés ciblés [254]. Lorsque les composés sont contenus dans les cellules, comme les polyphénols ou les lipides de grenade, ces traitements visent principalement la dégradation des parois cellulaires [255]. En ce sens, les fermentations spontanées (ensilage) et contrôlées discutées précédemment pourraient aussi être considérées comme des prétraitements des co-produits de grenades. La paroi cellulaire végétale peut être dégradée par des moyens physiques, chimiques ou biochimiques, mais certaines méthodes peuvent aussi entraîner la dégradation des composés ciblés [254–256].

Les méthodes physiques appliquées pour les produits du secteur alimentaire reposent entre autres sur des variations de la température ou de la pression, ou la génération de micro-ondes, d'ultrasons ou de champs électriques pulsés [255]. Le prétraitement par micro-ondes de la partie interne de la graine de grenade augmente le rendement en huile de 6 % et de 4 % par extraction au Soxhlet à l'hexane ou par CO<sub>2</sub> supercritique, respectivement [88], et jusqu'à 9 % au Soxhlet à l'éther de pétrole, selon la puissance et la durée d'extraction [257]. Cette méthode a cependant un effet nuancé sur la teneur relative en acide punique qui augmente de moins de 1 % (100 W, 2 min) avant l'extraction au Soxhlet à l'hexane, et de 0,5 à 6 % avant l'extraction par CO<sub>2</sub>

supercritique (100W, 2-6 min ; 250 W, 6 min ; et 600 W, 2-6 min) [88]. Dans les autres conditions, cette teneur diminue de 1,4 à 6,6 %, et les variations les plus importantes sont retrouvées lorsque les graines sont extraites au Soxhlet à l'hexane. Le traitement par micro-ondes à une puissance de 261 W pendant 1,7 min influence de la même manière le rendement en huile des graines entières, qui varie de 12-16 % à 13-17 % [258]. Cependant, aucun effet bénéfique sur la teneur relative en acide punique n'a été noté, puisqu'elle diminue jusqu'à 7 % selon la variété de grenade considérée. L'amélioration de l'extraction de l'huile a par ailleurs été attribuée à la dénaturation des cellules parenchymateuses par microscopie à balayage (figure 1.20). L'impact des micro-ondes sur l'extraction des polyphénols des péricarpes de grenades a été étudié dans le but de sécher la matière et a donc été discuté précédemment, de même que l'extraction assistée par micro-ondes. En revanche, le prétraitement des péricarpes par micro-onde n'a pas fait l'objet d'études à notre connaissance.

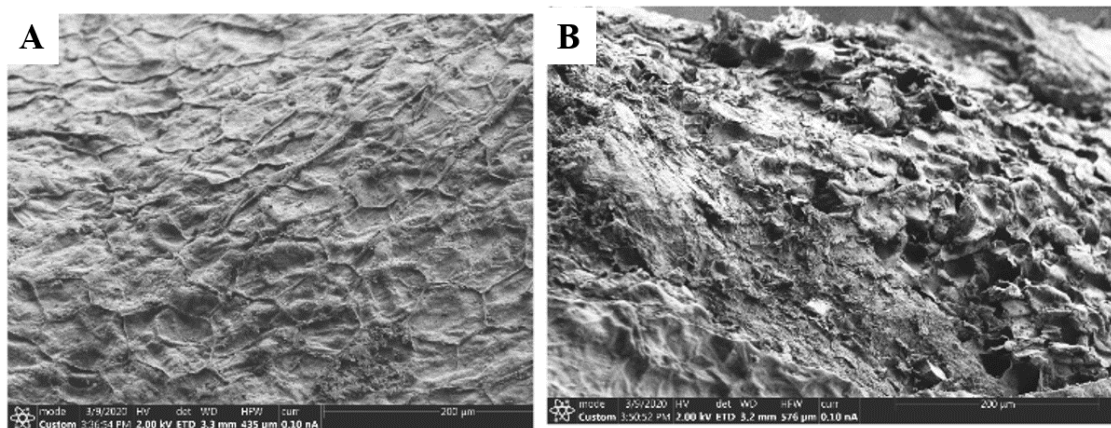


Figure 1.20 : Dégradation des cellules parenchymateuses des graines de grenades par micro-onde (261 W, 102 s). Graines non traitées (A) et traitées (B). Reproduit depuis Kaseke et al. [258].

Parmi les méthodes chimiques, les milieux acides dégradent suffisamment les parois cellulaires pour en extraire les composés actifs [254]. Néanmoins, la sensibilité aux acides des dérivés glycosylés comme les ellagitannins [259] et l'hydrophobicité des acides gras de la graine les rendent inadéquats pour l'extraction des polyphénols et lipides des co-produits de grenade.

Les méthodes biochimiques de prétraitement de la matière reposent quant à elles généralement sur l'ajout d'enzymes dégradant les constituants des parois végétales : cellulase, hemicellulase, pectinase [256]. Le prétraitement enzymatique a été optimisé pour améliorer l'extraction des composés phénoliques et la capacité antioxydante des extraits de péricarpe de grenade [260]. Parmi les 6 mélanges d'enzymes ou les traitements mono-enzymatiques, le rendement d'extractibles et la teneur en polyphénols totaux les plus élevés (32-66 % g/g ms et 219-302 mg eag/g ms respectivement) ont été observés pour un mélange comprenant cellulase, pectinase et protéase en proportion 50:25:25. Les plus faibles ont été obtenus pour le contrôle (19-36 % et 153-181 mg eag/g ms) [260]. Cette méthode permet ainsi d'augmenter le rendement de l'extrait de 70 à 80 % et la teneur en polyphénols totaux de 40 à 70 %, par rapport à la macération éthanolique ou à l'extraction par CO<sub>2</sub> supercritique avec de l'éthanol comme co-solvant. Cependant, son effet sur l'activité

antioxydante reste à déterminer car semble fortement lié à la méthode de quantification. Cette étude a aussi mis en lumière un ratio solide-liquide et une durée de seuils à partir desquels le rendement en extractible n'évolue plus, et des températures et pH optimaux dépendants du type d'enzymes [260].

Alexandre et al. [176] ont également traité les péricarpes de grenades avec un mélange de pectinase et de cellulase, mais n'ont pas noté d'amélioration du rendement en extractibles (39-40 % g/g ms), de la teneur en polyphénols totaux (201-206 mg eag/g ms) et de la capacité antioxydante (322-329 mg équivalent Trolox/g ms). Néanmoins, ce prétraitement affecte les teneurs en polyphénols individuels. Les teneurs en punicalagine, bis-HHDP-glucoside, et digalloylpentoside augmentent de 864,0 à 932,0, de 226,8 à 236,4, et de 0 à 34,0  $\mu\text{g/g ms}$ , respectivement, tandis que la teneur en galloyl-HHDP-glucoside diminue de 57,2 à 50,6  $\mu\text{g/g ms}$  [176].

Le prétraitement enzymatique semble donc avoir des effets contradictoires sur l'extraction des polyphénols des péricarpes de grenades, mais dans l'ensemble bénéfiques. Les images en microscopie électronique à balayage (MEB) montrent une détérioration de la matière (figure 1.21) qui expliquerait une augmentation des rendements [260]. Les divergences entre les deux études pourraient résulter d'autres phénomènes impliqués dans l'efficacité de l'extraction des polyphénols ou leur préservation, comme les méthodes de séchage et broyage de la matière.

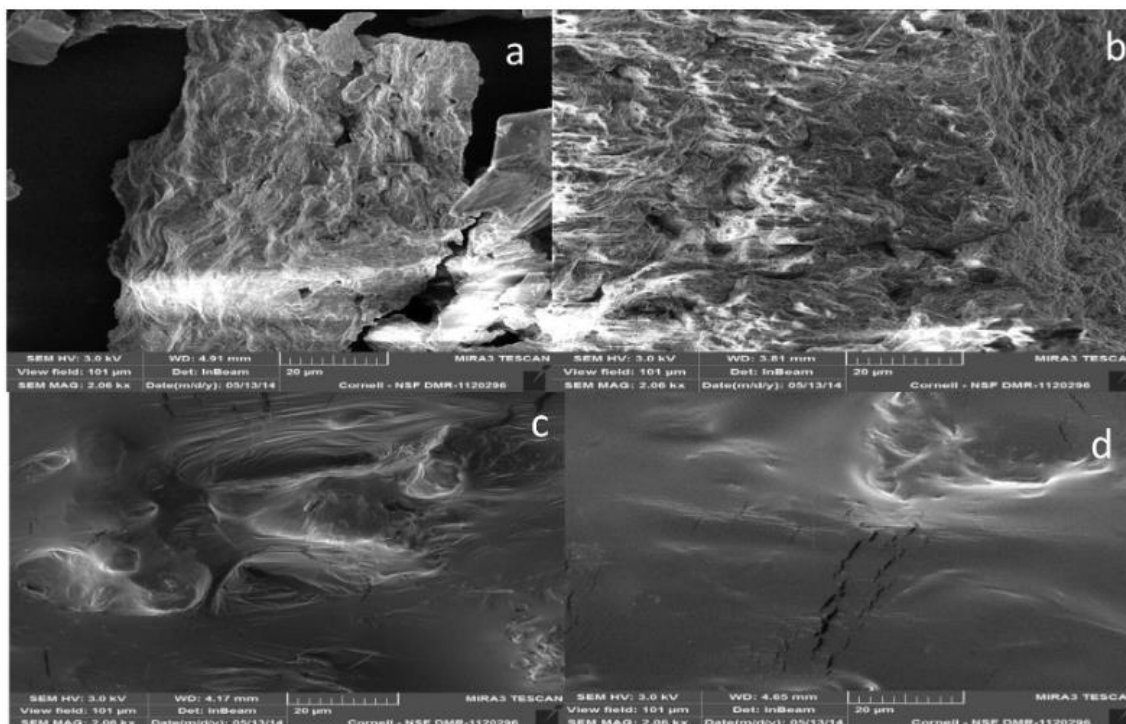


Figure 1.21 : Dégradation des péricarpes de grenades par prétraitement enzymatique. Péricarpes non traités (a) et traités avec la cellulase acide (b), un mélange de pectinase, protéase et cellulase (c) ou un mélange commercial, Viscozyme (d). Reproduit depuis Mushtaq et al. [260].

### 1.5.3. Conclusion

Les facteurs post-récolte affectent la composition moléculaire des co-produits de grenade et notamment les polyphénols et lipides qu'ils contiennent.

La conservation des grenades influence fortement leur qualité en termes de caractéristiques qualitatives et de composition chimique, bien que cette dernière ait moins été étudiée. Les conditions de conservation des grenades limitant les altérations du fruit sont une température comprise entre 5 et 10 °C, et une humidité relative élevée. Certains traitements thermiques ou par immersion ont aussi montré un intérêt, mais plus limité que la température et l'humidité. En effet, les basses températures induisent des lésions dues au froid qui génèrent un stress oxydatif et l'humidité relative peut permettre le développement de micro-organismes à l'origine de modifications biochimiques des fruits.

Les composés phénoliques des péricarpes de grenades semblent également être affectés par les paramètres de conservation avec des fluctuations de leurs teneurs lorsque les fruits sont placés à plus de 5 °C. Néanmoins, des recherches plus approfondies sur les mécanismes sous-jacents sont nécessaires pour comprendre les variations observées au cours du temps. Les études suggèrent qu'elles seraient liées à la régulation des gènes des voies de biosynthèse des antioxydants. Le profil en acides gras des graines de grenades semble quant à lui être influencé principalement par la température de conservation. Une température inférieure à 5 °C semble entraîner une diminution des teneurs en acides gras alors qu'elle reste similaire lorsque la température excède 5 °C. De la même manière que pour les polyphénols, les variations du profil lipidique des graines de grenades pendant la conservation des fruits peuvent être liées au stress oxydant puisqu'un des rôles des acides gras poly-insaturés, majoritaires, est la protection contre ce type de stress.

La conservation des co-produits de grenade a fait l'objet de peu d'études à notre connaissance. Les péricarpes séparés du fruit seraient principalement sensibles à l'augmentation de la durée et, dans une moindre mesure, à la température de conservation. Certains polyphénols semblent se dégrader après une semaine, tandis que d'autres sont stables à température ambiante ou inférieure à 5 °C. Ces différentes tendances pourraient s'expliquer en partie par des taux d'oxydation différents générés par des phénomènes physiologiques (activité enzymatique) ou chimique (photooxydation), mais des recherches approfondies doivent être menées pour identifier avec précision les composés dégradés et formés pendant la conservation de ces co-produits. La stabilité des autres co-produits formés par la transformation des grenades, les co-produits de pressage des graines, n'a pas encore été étudiée au cours de leur conservation. Néanmoins, les polyphénols résiduels pourraient subir des changements similaires à ceux des composés phénoliques des péricarpes. La conservation des co-produits de la grenade à température ambiante pendant une période limitée pourrait prévenir des modifications de leur composition, mais d'autres recherches doivent être effectuées.

La conservation humide à court terme des co-produits implique la transformation des co-produits le plus rapidement possible après leur collecte pour éviter toute dégradation. D'autres procédés permettent de pallier cette problématique et de réduire les coûts environnementaux et économiques de leur valorisation. En ce sens, le séchage



et l'ensilage (fermentation spontanée) des co-produits de grenade paraissent constituer des alternatives intéressantes.

Le séchage a beaucoup été étudié et optimisé afin de préserver plus longtemps les co-produits de la grenade. La teneur en polyphénols des péricarpes diminue avec l'augmentation de la température de séchage de 40 à 60 °C, tandis que les co-produits de graines peuvent être séchés jusqu'à 70 °C sans changement de leur profil en acides gras. De nouvelles méthodes de séchage, comme le séchage sous vide par micro-ondes ou le séchage par tambour rotatif, pourraient réduire la durée du séchage des co-produits de grenade tout en minimisant les pertes en polyphénols.

Contrairement au séchage, l'ensilage des co-produits de grenade n'a pas encore été bien étudié bien qu'il ait montré divers effets sur la composition d'autres matières végétales. Les péricarpes de grenades ensilés montrent une teneur en polyphénols totaux plus élevée mais une diminution en tannins hydrolysables, dont font partie les ellagitannins. Les variations de composition durant l'ensilage pourraient donc augmenter le rendement d'extraction de certains composés, et en ce sens ce procédé pourrait être considéré comme un prétraitement de la matière. D'autres traitements des co-produits de grenades ont démontré leur efficacité pour augmenter les rendements d'extraction. Le prétraitement par micro-ondes de la partie interne de la graine améliore le rendement en huile, et le prétraitement enzymatique celui des polyphénols et l'activité antioxydante des péricarpes.

## **1.6. Conservation des huiles et des extraits des co-produits de grenade**

Les co-produits de grenade contiennent des polyphénols et des acides gras conjugués poly-insaturés, obtenus dans des extraits hydroalcooliques et l'huile de grenade, respectivement. Une période de conservation de ces produits peut être nécessaire entre leur production et les étapes de commercialisation ou de traitement ultérieures. Cette phase peut entraîner des altérations ou oxydation des composés bioactifs. Par conséquent leur stabilité au cours du temps doit être prise en compte pour construire des voies de valorisation complètes des co-produits de grenade en produits commercialisables. Les points abordés dans cette partie sont aussi inclus dans l'article intitulé *Pomegranate by-product valorization from field to food : impact of storage and processing on by-product and their value added molecules*, soumis à publication dans le journal *Trends in Food Science and Technology* [14].

### **1.6.1. Stabilités des extraits de péricarpes**

La stabilité d'extraits aqueux de péricarpes de grenades stérilisés a été étudiée lors de la conservation à 4 °C par Qu et al. [261]. Les influences de la durée de conservation, du pH et de la lumière ont été établies sur les caractéristiques qualitatives des extraits (pH, solides hydrosolubles et couleur) mais aussi chimiques (teneurs en polyphénols et activité antioxydante). L'opacité des contenants à la lumière affecte principalement la couleur des extraits, alors que l'ajustement du pH avant la conservation change leur teneur en hydrosolubles et leur couleur. Au cours de la conservation jusqu'à 180 jours, des diminutions de plus de 30 % de la teneur en polyphénols totaux et de plus de 40 % de l'activité antioxydante des extraits ont été notées. La teneur en acide gallique

augmente avec la durée de conservation jusqu'à 180 jours à pH 5 alors que celle en acide ellagique varie fortement de 10 à 37 mg/L autour de la valeur initiale. La conservation à court terme dans des contenants opaques à faible pH est ainsi recommandée pour minimiser les pertes en polyphénols et en capacité antioxydante des extraits. Ces résultats sont cohérents avec le fait que la punicalagine, le principal polyphénol des péricarpes de grenades, est stable jusqu'à 30 °C à l'obscurité. Une exposition de 30 minutes à la lumière diminue de 16,4 % la quantité de la molécule [243].

L'influence de la température de conservation de 4 à 37 °C sur la qualité de ces mêmes extraits a été évaluée dans une autre étude [262]. Globalement, les teneurs en polyphénols totaux et punicalagine ainsi que l'activité antioxydante diminuent aussi au cours du temps, avec des pertes maximales de 44 %, 37 % et 40 %, respectivement, à 37 °C après 180 jours. L'augmentation de la température est inversement proportionnelle à la couleur et la teneur en punicalagine de l'extrait, mais n'affecte pas le pH, la teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante. En revanche, les teneurs en acides ellagique et gallique semblent être corrélées positivement à la température jusqu'à 60 jours de conservation. Ces variations ont été attribuées à une potentielle hydrolyse des tanins hydrolysables. La teneur en acide ellagique après la conservation d'un extrait aqueux de péricarpes de grenades peut aussi diminuer lorsque l'extrait est conservé dans un milieu tamponné à pH 5,5-8, à 30 °C et dans l'obscurité [263]. Dans ces conditions, cette teneur diminue constamment au cours du temps jusqu'à 119 jours. Les pertes sont de moins de 2 % après 21 jours, et jusqu'à 75-80 % après le 119<sup>ème</sup> jour de conservation.

Kaderides et al. [264] ont aussi évalué les changements des teneurs en polyphénols totaux et punicalagine ainsi que de l'activité antioxydante d'extraits aqueux de grenade pendant 40 jours, mais à une température plus élevée, de 60 °C. Les teneurs en polyphénols totaux et punicalagine, et l'activité antioxydante fluctuent de la même manière les deux premiers jours, avec de fortes diminutions de 60 %, 36 % et 45 %, respectivement. Du deuxième au septième jour, la teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante augmentent de 10 et 35 %, respectivement, alors que la teneur en punicalagine continue à baisser, jusqu'à 20 % en moins. De 7 à 40 jours de conservation, les diminutions des teneurs en polyphénols totaux et punicalagine, et l'activité antioxydante fluctuent de 40 à 70 %, de 36 à 57 % et de 75 à 90 %, respectivement, par rapport aux valeurs initiales. Les baisses plus élevées observées dans cette étude sont potentiellement liées à la température de stockage plus importante.

Les extraits de péricarpes de grenades et les polyphénols qu'ils contiennent semblent se dégrader lors de leur conservation. Les conditions permettant de maintenir leur qualité sembleraient être des contenants opaques, un pH légèrement acide, et une température faible. Néanmoins les polyphénols se dégradent au cours du temps même dans ces conditions, et une durée minimale de conservation semblerait plus adéquate. Par ailleurs, le séchage de l'extrait de péricarpe de grenade permet de maintenir la teneur en acide ellagique jusqu'à 119 jours à la lumière ou à des températures comprises entre 4 et 30 °C. Cette teneur est également stable pendant 119 jours à 45 °C et 75 % d'humidité relative [263]. Le séchage des extraits de péricarpes de grenades pourrait donc permettre de réduire les pertes en polyphénols au cours de la

conservation, notamment des ellagitannins. En revanche, certains polyphénols pourraient tout de même être dégradés, comme les anthocyanes [265].

### 1.6.2. Stabilité de l'huile de grenade

La stabilité de l'huile de grenade obtenue par pressage à froid de la partie interne de la graine de grenade a été étudiée par Melo et al. [266]. L'oxydation de l'huile a été mesurée par la méthode Rancimat®, qui mime le processus d'oxydation avec un flux de dioxygène (20 L/h) et une température élevée (110 °C). Pour l'huile grenade, le temps d'induction est de 0,73 heure. Selon Anwar et al. [267] le procédé Rancimat® accélère l'oxydation de l'huile d'un facteur deux à chaque incrément de température de 10 °C, ce qui est conforme aux données techniques du constructeur. L'oxydation de l'huile de grenade débutant après 0,73 h à 110 °C, elle pourrait donc commencer après 186,88 h (7,8 jours) à 30 °C et 747,5 h (31,2 jours) à 10 °C. La stabilité oxydative de l'huile de grenade commerciale a également été étudiée par cette méthode par Comunian et al. [268] à 90 °C et avec un débit de dioxygène similaire. Le temps d'induction est de 2,71 h à 90 °C, ce qui équivaut à 173,4 h (7,2 jours) à 30 °C et 693,8 h (28,9 jours) à 10 °C et est cohérent avec l'étude précédente. Les légères différences pourraient être dues à un profil en acides gras différent lié à l'origine des grenades ou à la méthode extractive non précisée pour l'huile commerciale.

Drinic et al. [269] ont aussi étudié la stabilité oxydative de l'huile extraite de la partie interne de la graine de grenade pendant 12 jours à 65 °C avec addition ou non d'antioxydant. Le taux d'acides gras libres de l'huile reste stable pendant sa conservation, tandis que les taux des marqueurs de l'oxydation augmentent. Par rapport à l'huile initiale, l'huile conservée pendant 12 jours présente une teneur relative en acide punique deux fois plus élevée (de 36,1 à 70,6 %), et les variations des teneurs de ses isomères entraînent une teneur en acides gras poly-insaturés (PUFA) globalement similaire. L'ajout d'extrait de péricarpes de grenades ou d'un antioxydant synthétique à l'huile n'influence pas son profil en acides gras au cours de la conservation [269]. En revanche, Hu et al. [270] ont observé une tendance opposée lors de l'étude de la stabilité de l'huile commerciale de grenade. L'huile conservée 7 jours à 60 °C montre une diminution significative des teneurs en acides linoléiques, une teneur stable en acide arachidique, et une augmentation des teneurs en acides palmitique, stéarique, oléique et linoléique. L'augmentation des acides saturés, mono et di-insaturés semble liée à une diminution des acides poly-insaturés jusqu'à 4 % au total, qui pourrait résulter de l'oxydation de ces derniers [270]. Ce phénomène a été largement décrit pour les acides oléiques et linoléiques dans des conditions de friture pour d'autres huiles végétales [271].

L'oxydation de l'huile de grenade semble débuter après un mois de conservation à 10 °C et 1-2 jours à 60 °C, selon la méthode de référence, mais l'évolution du profil en acides gras, notamment des acides gras poly-insaturés, semble incertaine au cours de la conservation à 60-65 °C pendant plus de 7 jours. Dans un cas, les résultats montrent une isomérisation des acides gras poly-insaturés (AGPI), et dans l'autre, une possible oxydation des doubles liaisons pour former des acides gras à plus faible degré d'oxydation. Les différences entre les études peuvent résider dans le nombre d'acides gras identifiés dans l'huile, les méthodes extractives, la période entre la production et l'analyse de l'huile, par exemple. De plus, l'apparente isomérisation des AGPI se

produit lorsque l'huile est placée à l'obscurité [269] alors que l'apparente oxydation [270] dans une bouteille transparente. L'importance de la photooxydation parmi les réactions d'oxydation des acides gras poly-insaturés [272] pourrait par conséquent aussi expliquer les variations entre les études.

### 1.6.3. Encapsulation

L'encapsulation améliore la durée de conservation des composés organiques en les protégeant de l'oxydation ou de la dénaturation [273]. Ce procédé pourrait donc prévenir les dégradations des polyphénols et lipides des extraits et de l'huile des co-produits de grenade pendant leur conservation. L'encapsulation nécessite l'incorporation du principe actif à la matrice, la préparation des particules et leur stabilisation. Chaque étape peut être mise en œuvre par de nombreux procédés, la méthode étant généralement définie selon la technique de préparation des particules [273].

#### 1.6.3.a. Encapsulation des extraits de péricarpes

Plusieurs méthodes d'encapsulation ont été décrites pour les extraits de péricarpes de grenades. Les principales reposent sur le séchage par atomisation (« *spray drying* ») [86,274,275] ou lyophilisation [265,276], et la gélification [277] après l'homogénéisation du mélange d'extrait et d'agent d'enrobage.

Goula et al. [86] ont encapsulé un extrait aqueux de péricarpes grâce à l'atomisation avec un mélange de maltodextrines, de poudre de lait écrémé, de protéines de lactosérum et de gomme arabique. Les particules avec l'efficacité d'encapsulation, le rendement et les paramètres mécaniques les plus élevés sont obtenues avec un enrobage de maltodextrines et protéines de lactosérum à un ratio de 1:9, un flux d'air de 22,8 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup> à 150 °C, et une concentration de solides d'alimentation de 30 % [86]. L'encapsulation d'un extrait aqueux a également été réalisée par Cam et al. [274] avec des maltodextrines et le même procédé. L'optimisation du procédé a montré que les rendements en polyphénols les plus élevés, incluant ceux en punicalagine et en acide ellagique, sont obtenus avec une température d'entrée de 160 °C et un ratio polyphénols/maltodextrine de 1/1 ou 1/3, sans influence du type de maltodextrine. De plus, la teneur en polyphénols des particules a été suivie pendant leur conservation à 4 °C pendant 90 jours. La teneur en polyphénols totaux de l'extrait de grenade séché diminue de 369,4 à 243,7 mg eag/g ms après 90 jours, tandis que celle de l'extrait encapsulé reste sensiblement similaire de 129,1 à 119,7 mg eag/g ms [274]. Kaderides et al. [275] ont aussi encapsulé un extrait aqueux de péricarpe de grenade avec des bagasses d'oranges par pulvérisation. Selon de Souza et al. [278], la bagasse d'orange contient des quantités élevées de pectines, qui peuvent remplacer les maltodextrines comme agent d'enrobage puisqu'elles sont également composées de glucides liés. L'encapsulation de l'extrait de péricarpe limite les pertes en polyphénols et en capacité antioxydante pendant 40 jours de conservation à 60 °C [275]. Des essais ont aussi été conduits pour évaluer l'influence de la préparation de biscuits à partir de l'extrait encapsulé. Les composés phénoliques encapsulés sont plus résistants à la cuisson des biscuits que l'extrait sec, avec 11 % de composés phénoliques supplémentaires dans le produit final. Néanmoins, une diminution globale de 65 % des

polyphénols est observée par comparaison avec l'extrait sec non soumis à la cuisson [275].

Nous pouvons donc retenir que l'encapsulation par atomisation avec des maltodextrines seules ou en mélange semble prévenir la dégradation des polyphénols présents dans des extraits aqueux de péricarpes de grenades, et que cet agent d'enrobage peut être remplacé par des co-produits végétaux contenant une haute teneur en pectines, comme la bagasse d'orange.

Les maltodextrines ont aussi été employées seules [276] ou en combinaison avec de l'alginate de calcium [265] pour encapsuler des extraits hydroalcooliques de péricarpes de grenades par lyophilisation. Selon les propriétés physico-chimiques et les images microscopiques de l'extrait encapsulé, les plus grandes particules sont obtenues avec un rapport extrait/maltodextrines de 1:2 [276]. Les punicalagine et l'acide ellagique sont retenus dans l'extrait encapsulé avec de la maltodextrine, qui démontre également des activités antioxydantes et antimicrobiennes [276]. Le suivi de la stabilité des anthocyanes d'un autre extrait de péricarpes a été réalisé à 4 et 25 °C, 52 et 75 % d'humidité relative pendant 42 jours après une encapsulation avec un mélange de maltodextrines et d'alginate de sodium [265]. L'humidité relative influence la teneur en anthocyanes à 4 °C avec une diminution plus importante de la teneur en anthocyanes totales à 52 % qu'à 75 % d'humidité relative. La diminution globale des anthocyanes totales suit une cinétique de premier ordre qui a permis d'estimer leur demi-vie. La demi-vie la plus élevée (116 jours) est observée pour les extraits encapsulés avec 10 % de maltodextrine et 0,1 % d'alginate de calcium, stockés à 4 °C et 75 % d'humidité relative. En revanche, les particules obtenues avec 15 % de maltodextrines et 0,1 % d'alginate de calcium ont la plus haute teneur en anthocyanes et les meilleures propriétés morphologiques, mais une demi-vie de 77 jours à 4 °C et 52 % d'humidité relative. L'utilisation de ce dernier procédé bien que moins efficace pour la conservation à long terme, améliorerait la durée de conservation des anthocyanes de 59 jours par rapport à l'extrait lyophilisé [265].

L'influence de l'encapsulation par lyophilisation sur la composition en polyphénols des extraits de péricarpes de grenades reste encore incertaine, puisque seule l'évolution des anthocyanes totale a été déterminée. Ces dernières, encapsulées avec un mélange de maltodextrine et d'alginate de 15 % et 0,1 %, respectivement, peuvent être conservées jusqu'à deux mois à 4 °C et 52 % d'humidité sans être altérées.

L'encapsulation d'extraits hydroalcooliques de péricarpes de grenades a aussi été conduite par gélification d'alginate par du chlorure de calcium [277]. Les extraits encapsulés ont des activités antimicrobiennes similaires ou supérieures aux extraits non encapsulés sur des pathogènes alimentaires *Salmonella enterica*, *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus* et *Lysteria monocytogenes*. De plus, le suivi de la conservation des particules a mis en évidence une stabilité de leur taille jusqu'à 3 semaines. Cependant, la teneur en polyphénols des particules diminue de 1 à 3 semaines de conservation à 4 °C et 90 % d'humidité relative.

L'encapsulation des extraits de péricarpe de grenade semble donc maintenir leurs propriétés chimiques mais aussi leur activité antioxydante ou antimicrobienne lorsque le procédé est optimisé. La durée de conservation des extraits semble ainsi améliorée.

### 1.6.3.b. Encapsulation de l'huile

La préservation de l'huile de grenade peut être améliorée par la préparation d'une émulsion suivie, ou non [270,279], d'une gélification [280] ou d'un séchage par atomisation [86,87,268,281–283]. La formation d'une émulsion entre l'huile et l'agent d'enrobage, a été étudiée avec des polysaccharides ou de l'amidon modifié et des émulsifiants.

La stabilisation de l'huile de grenade commerciale (Chine) avec une émulsion contenant de l'ovalbumine et de l'ovalbumine modifiée par glycosylation a été suivie pendant 7 jours à 24 et 60 °C. La plus faible diminution, de 76,3 à 73,1 %, des teneurs en isomères d'acide linoléique, incluant l'acide punicique, est obtenue avec l'ovalbumine glycosylée qui préserve 98 % des acides gras poly-insaturés totaux après la conservation à 60 °C. L'indice de peroxyde est aussi le plus bas dans l'émulsion contenant de l'ovalbumine glycosylée à 24 °C, par rapport à l'émulsion d'ovalbumine [270]. La stabilité d'une autre huile commerciale (Iran) et de son émulsion avec du polysorbate 80 ou Tween-80 (Polyoxyéthylène (20) sorbitan monooléate) a aussi été étudiée avec ou sans ajout d'alpha-tocophérol pour ses propriétés antioxydantes [279]. La supplémentation en alpha-tocophérol diminue la taille des gouttelettes de l'émulsion et l'efficacité de l'encapsulation (de 99,5 % à 90,4 %), et augmente sa viscosité et son activité antioxydante. Le pH (2-8) et la température (20-100 °C) du milieu affectent fortement la stabilité de l'émulsion, alors que la salinité (0 à 500 mM de NaCl) a un effet moindre. Pour éviter toute dégradation de l'émulsion avec un ratio huile/tocophérol de 1:4, un pH de 5,5 et une température ambiante sont recommandés. Néanmoins, plus la conservation s'étend, plus la teneur en alpha-tocophérol diminue, jusqu'à 20 % en 50 jours à 25 °C. Cette diminution est associée avec une plus faible teneur en peroxydes, produits principaux de l'oxydation, mais des teneurs comparables des seconds produits d'oxydation. La présence d'alpha-tocophérol dans une émulsion avec de l'huile de grenade semble donc ralentir partiellement son oxydation à 25 °C jusqu'à 50 jours [279].

Des émulsions d'huile de grenade ont ainsi pu être stabilisées avec succès avec de l'ovalbumine glycosylée ou du polysorbate 80. Dans le premier cas, le profil en acides gras de l'émulsion a montré une importante stabilité après la conservation à 60 °C pendant 7 jours, notamment en ce qui concerne les teneurs en acides gras poly-insaturés. Dans le second, l'ajout d'alpha-tocophérol a diminué une partie des marqueurs de l'oxydation à 25 °C pendant 50 jours bien qu'une réduction de l'efficacité de l'encapsulation ait aussi été notée.

L'encapsulation à base d'hydrogel de l'huile de grenade commerciale (Chine) par chaleur et micro-ondes a été optimisée par Li et al. à l'aide d'ovalbumine, d'inuline et de  $\kappa$ -carraghénane [280]. Les huiles encapsulées contiennent 3 à 6 % d'isomères d'acide linoléique en moins (de 77,5 à 71,6-75,1 %), une teneur en acide arachidique similaire (2,18-3,04 %), et des teneurs en acides palmitique, stéarique, oléique et linoléique plus élevées (de 3,2, 3,6, 5,9, 7,2 à 3,7-4,8, 3,7-4,7, 6,3-7,2, 8,7-10,0 %, respectivement) après 9 jours de stockage à 60 °C par rapport à l'huile initiale. Les changements les plus faibles sont observés pour l'émulsion ayant subi le plus long traitement aux micro-ondes (350 W, 10 min). Ces variations étant aussi associées à l'oxydation des acides gras poly-insaturés, l'extension du traitement par micro-ondes semble limiter cette réaction [280].

Le séchage par atomisation d'émulsions d'huile de grenade a aussi été étudié dans le but d'obtenir des efficacités et rendements d'encapsulation élevés. L'optimisation de l'encapsulation de l'huile de grenade par atomisation a montré une efficacité et un rendement plus élevés avec des maltodextrines et du polysorbate 80, un ratio huile/agent d'enrobage de 1:3,7, une température et un débit d'entrée d'air de 150 °C et de 22,8 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup>, et une concentration en matières solides de l'alimentation de 30 % [86,87]. Une autre optimisation de l'encapsulation de la même huile avec des maltodextrines et de la poudre de lait écrémé a montré des paramètres différents [281], en raison des compositions chimiques variables des agents d'enrobages. Les paramètres de l'encapsulation nécessitent donc une adaptation selon les réactifs employés. L'encapsulation de l'huile de grenade par atomisation avec un agent d'enrobage biosourcé (amidon de taro) et de la bêta-cyclodextrine a été optimisée par Cortez-Trejo et al. [282]. Les conditions optimales du point de vue de l'efficacité d'encapsulation entraînent une efficacité de 61 %, une petite taille de particule (10,2 µm de diamètre moyen) et un indice de peroxyde de 6,2 milliéquivalent de dioxygène (meq O<sub>2</sub>)/kg. Costa et al. [284] ont encapsulé une autre huile de grenade commerciale avec des protéines de lactosérum et de la gomme arabique. Le procédé réduit la teneur en acide punicoïque de 69 à 60-63 % et augmente celle des isomères minoritaires de l'acide linolénoïque. Les variations de la teneur relative en acide punicoïque peuvent donc être dues à son oxydation ou à son isomérisation qui se produit aux températures du procédé (66-180 °C).

L'effet de la conservation de l'huile encapsulée par atomisation a aussi été évalué. L'intérêt de l'ajout l'amidon modifié Capsul® aux protéines de lactosérum lors de l'encapsulation d'une huile de grenade a été étudié par Comunian et al. [268,285] dans le but de réduire les réactions d'oxydation. L'encapsulation avec les protéines de lactosérum seules préserve le profil en acides gras, prévient la génération de composés organiques volatils issus des réactions d'oxydation, mais n'empêche pas l'altération des propriétés physiques des particules après leur conservation 30 jours à 40 °C [268]. L'ajout d'amidon modifié Capsul® réduit la taille des particules et améliore l'efficacité et le rendement d'encapsulation ainsi que la stabilité des particules pendant le processus d'oxydation accélérée (Rancimat®, 90 °C) en augmentant le temps d'induction de 2,7 et 7,2 h à 21,2 h, pour l'huile non encapsulée, encapsulée avec des protéines de lactosérum seules, et encapsulée avec ajout de l'amidon modifié, respectivement [285].

L'huile encapsulée peut ainsi être conservée sans altération à 10 °C pendant 76,8 ou 226,5 jours (2,6 ou 7,6 mois) sans ou avec ajout d'amidon modifié Capsul®, par rapport à l'huile initiale. Le profil en acides gras et notamment les teneurs en acide punicoïque et ses isomères sont mieux préservés (perte de 0 à 30 % selon l'acide gras) par l'addition d'amidon modifié à la formulation jusqu'à 20 jours à 40 °C, puis, après 30 jours de conservation, ceux des microcapsules sans cet amidon sont les plus hauts (perte de 30 à 50 % selon l'acide gras).

L'ajout d'antioxydant à l'émulsion avant le séchage par atomisation a aussi été étudié avec du jus de grenades [283]. Le jus de grenades contient en effet une quantité élevée d'anthocyanes et d'autres composés phénoliques antioxydants, et peut par conséquent remplacer l'eau dans le procédé. La présence du jus dans l'émulsion améliore l'efficacité d'encapsulation (96,4-96,6 %), diminue la capacité de

charge (de 13,9-14,0 % à 13,7-13,8 %), et augmente la sphéricité des particules sans modifier leur taille, selon la proportion de jus. La stabilité de l'huile initiale et encapsulée pendant 30 jours de stockage à 25 et 60 °C a été suivie par l'indice de peroxyde. Cet indice augmente de manière similaire entre les deux produits jusqu'à 20 jours et est plus élevé lorsque la température est de 60 °C. Du 20<sup>ème</sup> au 30<sup>ème</sup> jour de conservation, l'encapsulation diminue l'indice de peroxyde.

Par conséquent, la conservation de l'huile de grenade est améliorée lorsqu'elle est encapsulée sous la forme d'une émulsion, d'un gel ou d'une poudre. En particulier, le profil en acides gras évolue peu pendant 7 à 9 jours à 60 °C et 0 à 20 jours à 40 °C, et l'oxydation de l'huile est ralentie de 28,8 heures à plusieurs mois selon le procédé d'encapsulation. L'ajout d'antioxydants dans la formulation limite aussi la génération de peroxydes due à l'oxydation du 18<sup>ème</sup> au 30<sup>ème</sup> jour de conservation à 25 ou 60 °C avec du jus de grenade, et du 1<sup>er</sup> au 50<sup>ème</sup> jour à 25 °C avec de l' $\alpha$ -tocophérol.

#### 1.6.4. Conclusion

La conservation des huiles et des extraits des co-produits de grenade a été exposée à travers leur stabilité et l'augmentation de celle-ci par encapsulation.

Les polyphénols des extraits de péricarpes sont sensibles à la conservation sur une longue période, en particulier les ellagitannins. Leur dégradation pourrait néanmoins être réduite par la diminution de la température de conservation de l'extrait. En revanche, les acides ellagique et gallique semblent moins affectés par la conservation, et leur teneur semble stable dans un extrait aqueux à pH acide et à l'obscurité. Le séchage de l'extrait semblerait limiter la diminution de la teneur en acide ellagique même à température élevée, mais a toujours un effet délétère sur d'autres polyphénols comme les anthocyanes. Le séchage des extraits de péricarpes pourrait également réduire une partie des pertes en polyphénols et son effet doit donc être évalué sur les principaux que sont les tannins hydrolysables. L'huile de grenade est aussi altérée pendant sa conservation en raison de sa sensibilité à l'oxydation liée à sa forte teneur en acides gras insaturés. Le profil en acides gras de l'huile est influencé par la durée et la température de stockage, qui entraînent des réactions d'isomérisation et/ou d'oxydation des doubles liaisons. Les produits de dégradation n'ont pas encore été décrits car forment un mélange complexe d'isomères et de produits d'oxydation de tous les acides gras initiaux.

Les dégradations des extraits et de l'huile de grenade peuvent être limitées par leur encapsulation. L'encapsulation de l'extrait de péricarpes de grenades est réalisable grâce aux propriétés physico-chimiques intéressantes des maltodextrines et de l'alginate, par rapport à d'autres agents d'enrobage. Ces agents d'encapsulation pourraient aussi être remplacés par des co-produits riches en pectines, comme la bagasse d'orange. En dehors des polyphénols, l'encapsulation préserve les activités antioxydantes et antimicrobiennes de l'extrait. La dégradation des composés phénoliques, notamment la punicalagine, les acides ellagiques et les anthocyanes est limitée par l'encapsulation, mais les paramètres de conservation doivent être contrôlés (température, humidité relative). L'encapsulation de l'huile de grenade a été conduite avec plusieurs procédés et agents d'enrobages, comme les maltodextrines, la bêta-cyclodextrine, la poudre de lait écrémé, les protéines de lactosérum et la gomme arabique, ainsi que des co-produits du secteur agroalimentaire contenant des



polysaccharides, comme l'amidon de taro. En général, l'huile encapsulée présente une meilleure stabilité aux conditions d'oxydation accélérée et son profil en acides gras est mieux préservé. L'ajout d'antioxydants comme l'alpha-tocophérol ou le jus de grenade à la formulation réduit d'autant plus l'oxydation de l'huile.

L'extrait et l'huile de grenade pourraient donc être conservés à court terme ou stabilisés pour un stockage à long terme par encapsulation qui réduit la dégradation des polyphénols pour le premier, et l'oxydation des acides linoléiques conjugués pour le second.

## 1.7. Conclusion

La composition chimique des co-produits de transformation des grenades a été beaucoup étudiée afin de trouver des applications dans les secteurs agroalimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques et des biomatériaux notamment. Les principales familles de composés semblent leur conférer une valeur ajoutée sont les polyphénols des péricarpes et les lipides de la partie interne de la graine, et par extension des co-produits de pressage des graines. Ces recherches ont mis en lumière de nombreux facteurs influençant leur teneur dans les co-produits de grenade.

Tout d'abord, comme pour toute matière première, les méthodes extractives et analytiques employées pour extraire et identifier ces composés engendrent des variations non négligeables des teneurs observées. En ce qui concerne les lipides, leur analyse est conduite très largement par chromatographie en phase gazeuse avec des méthodes proches, alors que différentes méthodes d'extraction ont été étudiées. Pour les polyphénols, de la même manière que pour les lipides, deux méthodes d'analyse sont largement utilisées – le dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu et la quantification des polyphénols individuels par chromatographie liquide haute performance – et de multiples méthodes d'extraction ont été mises au point, comparées et optimisées. Ensuite, l'origine des grenades et le conditionnement des co-produits semblent jouer un rôle prépondérant dans les teneurs en lipides et polyphénols extraits. Certains traits sont invariables, comme la dominance de l'acide punicique parmi les acides gras des co-produits de pressage des graines ou celle de la punicalagine parmi les polyphénols des péricarpes. Néanmoins leurs teneurs varient selon les variétés de grenade, la localisation et les méthodes culturales, et la maturité des grenades. Enfin, après la récolte, la conservation des grenades et des co-produits ainsi que le conditionnement des co-produits influencent ces teneurs.

## 1.8. Verrous scientifiques et objectifs des travaux

Le grenadier, la grenade et ses co-produits de transformation sont étudiés depuis de nombreuses années, et de nombreux facteurs influençant les composés présents dans le fruit ont été élucidés à ce jour. Par exemple, l'influence de la variété de grenade sur les teneurs en lipides et polyphénols des co-produits a été évaluée sur des grenades originaires d'Inde, des États-Unis, d'Espagne, d'Israël, de Chine, de Turquie, d'Italie, du Mexique et d'autres pays autour du monde. Dans le sud de la France, les producteurs de grenade cultivent ces variétés importées, notamment Wonderful (États-Unis), Mollar de Elche (Espagne), Acco (Israël) mais aussi une

variété endémique, Provence. Cette variété a fait l'objet d'une seule étude [286] portant sur la teneur en polyphénols totaux et individuels d'une décoction de péricarpes de grenades cultivées en Italie. D'après les informations sur les méthodes extractives des polyphénols et notamment l'effet du solvant et de la température, la caractérisation des polyphénols des péricarpes de la variété Provence pourrait être améliorée, notamment par l'évaluation des teneurs dans les péricarpes.

Les parcelles cultivées dans le sud de la France sont soumises à un climat Méditerranéen avec des spécificités de température, précipitations et type de sol. Par exemple, le climat est beaucoup plus tempéré avec des gelées printanières plus fréquentes et un été moins chaud. Par conséquent, l'évaluation de l'effet des conditions pédoclimatiques spécifiques du sud de la France sur les polyphénols et lipides des grenades permettrait d'améliorer les connaissances globales sur l'effet des conditions de culture de la grenade.

L'application d'un traitement foliaire pour diminuer l'éclatement des grenades a été décrite dans la littérature, et comme précisé précédemment, les nutriments semblant les plus pertinents seraient le calcium, le bore et le zinc. L'effet de l'application foliaire de ces nutriments sur les teneurs en polyphénols et en lipides des grenades a été décrit récemment sur le rendement en huile des graines de grenades [188]. L'intérêt d'un tel traitement foliaire est la limitation de l'éclatement des fruits, et donc la limitation des altérations de l'enveloppe des grenades qui contiennent notamment des polyphénols. L'évaluation de l'effet de ce type d'application sur les polyphénols des péricarpes pourrait donc mettre en exergue certains phénomènes se produisant lors de l'éclatement des fruits.

Ces travaux de recherche proposent donc l'étude de l'effet des conditions de culture des grenades Provence et Mollar de Elche sur les polyphénols et les lipides de leurs co-produits de transformation.

Ensuite, la conservation des grenades est actuellement un challenge pour la commercialisation des grenades en frais, en partie à cause de la saisonnalité de la récolte. En France, ce type de vente n'est pas courant, mais les différences de période de récolte des grenades destinées à la transformation entraînent aussi la nécessité de conserver les fruits. Lors de la conservation des grenades, certains phénomènes physiologiques peuvent conduire à des changements de composition.

Nos travaux visent donc également l'étude de l'évolution des lipides des co-produits de pressage des graines et des polyphénols des péricarpes pendant la conservation des grenades.

Par ailleurs, le délai entre la production des co-produits de grenade et leur transformation peut aussi induire des changements de composition chimique, qu'il est nécessaire d'évaluer pour maintenir leur qualité. Plusieurs méthodes de stabilisation des co-produits ont été proposées ces dernières années, et leurs impacts évalués sur les lipides et polyphénols des co-produits. Parmi celles-ci, le séchage des co-produits a été particulièrement étudié, mais semble pouvoir détériorer certains composés. D'autres études ont aussi montré que la fermentation spontanée, ou l'ensilage, des co-produits pourrait permettre de les stabiliser afin de les inclure dans des rations d'alimentation animale.

Nos travaux ont donc enfin pour objectif d'évaluer les impacts du séchage et de l'ensilage sur les lipides et polyphénols des co-produits de grenades occitanes.

Les objectifs des travaux de thèse sont synthétisés sur la figure 1.22 et répondent à deux défis. Le premier est technologique, en lien avec le projet GIMMS, et a pour but de proposer des procédés en amont des voies de valorisation des co-produits de grenade occitanes permettant de maximiser les teneurs en composés à valeur ajoutée qu'ils contiennent. Le second défi est scientifique, vise à améliorer la compréhension des effets de la culture du grenadier, la conservation des grenades et le conditionnement des co-produits sur les lipides et polyphénols qu'ils contiennent.

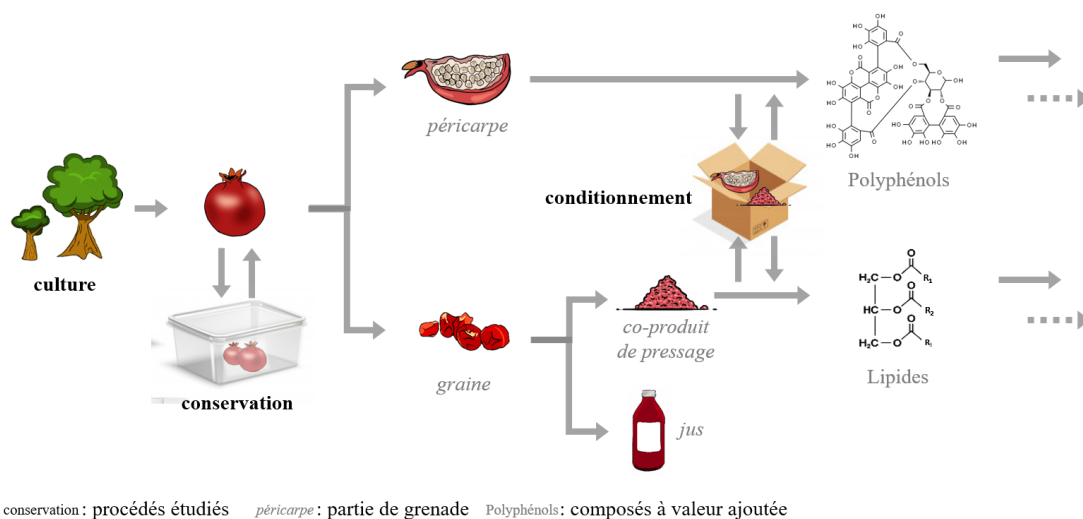


Figure 1.22 : Résumé des objectifs des travaux de thèse.

L'**objectif général** de ces travaux de thèse est par conséquent l'étude de l'évolution des teneurs en composés à valeur ajoutée des co-produits de pressage des grenades occitanes à travers les pratiques culturelles existantes ainsi que l'optimisation de la conservation des grenades et du conditionnement des co-produits.

Les connaissances actuelles montrent que les trois étapes de culture, conservation et conditionnement de la filière grenade engendreraient des variations dans les teneurs en lipides et polyphénols des co-produits. Trois études seront ainsi présentées et discutées à travers trois chapitres.

- **Etude de l'influence des conditions de culture des grenadiers sur les teneurs en composés à valeur ajoutée des co-produits de pressage des grenades (chapitre 3)**

Des liens importants ont été décrits entre des facteurs pré-récolte et la composition des différents tissus de la grenade. La variété, les conditions pédoclimatiques de culture ainsi que le stade de développement des grenades auraient particulièrement une influence sur les teneurs en lipides des graines ou de leur partie interne et en polyphénols des péricarpes. Dans un contexte de transformation en jus de la production de grenades, la récolte des fruits est effectuée à leur maturité. Ce facteur ne paraît donc pas le plus pertinent pour notre étude contrairement aux deux autres. En effet, plusieurs variétés de grenades sont cultivées à travers l'Occitanie, et les pratiques culturelles ne

sont pas encore harmonisées. Cette étude montrera donc les variations des teneurs en lipides et en polyphénols des co-produits de grenade en lien avec la variété et les conditions pédoclimatiques de culture. Par ailleurs, la diminution du taux d'éclatement des grenades avant leur récolte est étudié dans le projet GIMMS par la pulvérisation foliaire de nutriment. Cette étude s'attache aussi à déterminer l'influence de l'apport de ces nutriment sur les teneurs en composés à valeur ajoutée des co-produits de grenade.

- **Etude de l'influence de la conservation des grenades sur les teneurs en composés à valeur ajoutée de leurs co-produits de pressage (chapitre 4)**

La majorité de la production française de grenades est transformée en jus. Les contraintes techniques liées à la période de récolte des variétés cultivées localement entraînent la nécessité de pasteuriser plusieurs fois le jus des variétés précoces au fur et à mesure que les variétés plus tardives sont transformées. Pour remédier à ces pasteurisations successives, les variétés précoces pourraient être conservées jusqu'à la récolte des variétés plus tardives. Cette étude propose donc l'évaluation de l'impact des conditions de conservation des grenades à la récolte précoce sur la composition de leurs co-produits en tenant compte de leur caractéristiques qualitatives (masse, couleur, aspect). Des liens pourront par conséquent être établis entre ces caractéristiques et l'évolution des teneurs en lipides et polyphénols des co-produits. Considérant les altérations des grenades décrites dans la littérature lors de leur conservation, il semble vraisemblable que leur composition chimique évolue aussi. Néanmoins, la variété de grenade semble aussi avoir un rôle prépondérant dans sa sensibilité à la conservation et il paraît donc essentiel de prendre en compte l'effet variétal par l'étude de la conservation de plusieurs variétés.

- **L'étude de l'influence de différents conditionnements des co-produits de pressage industriel sur les teneurs en composés à valeur ajoutée (chapitre 5)**

Parmi les facteurs post-récolte montrant une influence sur la composition des co-produits de grenade, leur conditionnement semble impacter fortement à la fois les lipides et les polyphénols qu'ils contiennent. Cette étape est cruciale pour stabiliser les co-produits pour leur valorisation. Compte-tenu de l'influence de l'origine des co-produits sur leur composition, l'étude du conditionnement des co-produits de grenades occitanes semble essentiel pour la construction des voies de valorisation. Les avantages de mise en place techniques du séchage et de l'ensilage ont conduit à la sélection de ces deux méthodes de conditionnement pour cette étude. Elle permettra de déduire les liens entre la température et le mode de séchage ainsi que la durée de fermentation spontanée des co-produits et leurs teneurs en lipides et polyphénols.

Ces trois études seront présentées dans les chapitres **3**, **4** et **5** après avoir décrit les matériels et méthodes employés dans le chapitre **2**.



## **2. MATERIEL ET METHODES**



Ce chapitre développe les méthodes mises en place pour répondre aux problématiques de ces travaux de thèse. Elles sont résumées dans la figure 2.1. Après avoir présenté les réactifs employés pour l'ensemble des travaux, la préparation des échantillons de co-produits sera exposée, puis les méthodes de caractérisation des fruits et des co-produits, et finalement les méthodes statistiques seront développées.

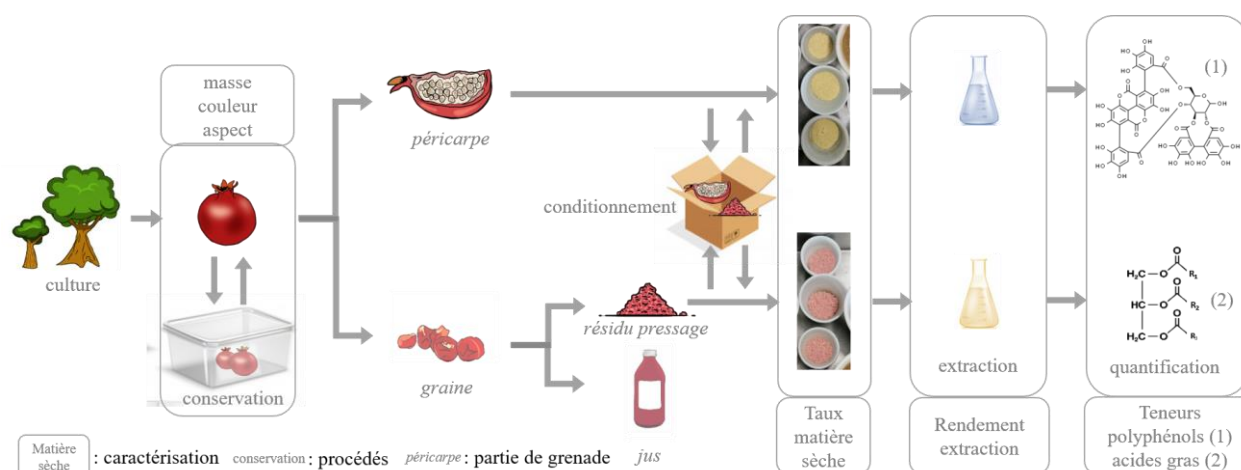


Figure 2.1 : Schéma général des méthodes employées dans les travaux de thèse.

## 2.1. Réactifs et solvants

Les solvants méthanol, cyclohexane, méthyl tert-butyl éther et acide formique de qualité analytique utilisés proviennent de *VWR International (Fontenay-Sous-Bois, France)*, l'éthanol 96 % de *Carlo Erba (Val de Reuil, France)*, et l'eau ultrapure produite avec un purificateur *Purelab Classic (VEOLIA, Toulouse, France)*. Les sels de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), bicarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ), sulfate de sodium anhydre ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), le réactif de Folin-Ciocalteu et l'hydroxyde de triméthylsulfonium (TMSH, 0,2 mL/L dans du méthanol) utilisés proviennent de *Sigma Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France)*, de même que les standards de polyphénols acides gallique et ellagique, et le standard contenant 37 acides gras de référence (*Supelco 37 Component FAME Mix*). Les deux autres standards punicalagine et punicaline ont été fournis respectivement par *Carbosynth Limited (Berkshire, Royaume-Uni)* et *Biosynth (Bratislava, Slovaquie)*. L'*Aloe vera* lyophilisé en poudre a été fourni par l'entreprise *SiBio! (St-Féliu-D'Avall, France)*.

## 2.2. Matériel végétal

L'étude globale a porté sur les variétés de grenades Acco, Mollar de Elche, Provence, Valenciana, et Wonderful. Les caractéristiques des fruits propres à chaque variété sont présentées dans le tableau 2.1.

Selon les objectifs des travaux et les contraintes des acteurs impliqués, les grenades ou leurs co-produits de transformation peuvent avoir des origines différentes sur le



territoire d'Occitanie et avoir été préparés et échantillonnés distinctement. Les méthodes relatives à chaque étude seront ainsi présentées dans les parties suivantes.

Tableau 2.1 : Caractéristiques des variétés de grenade étudiées. Adaptation des fiches variétales élaborées par la plateforme expérimentale SudExpé.

Variété	Origine	Localisation parcelle	Date récolte	Sensibilité gel	Couleur Surface	Couleur Graine	Calibre fruit	Sensibilité éclatement
Acco	Israël	Occitanie	fin septembre	Faible à moyenne	Rouge	Rouge foncé	Moyen	Moyenne
Mollar de Elche	Espagne	Occitanie (30, 34, 66)	fin octobre	Forte	Rose, jaune-vert	Rouge rosé	Gros	Moyenne à forte
Provence	France	Occitanie (30, 34, 66)	octobre	Faible à moyenne	Rose, jaune clair	Rose	Moyen à gros	Moyenne à forte
Valenciana	Espagne	Occitanie	début octobre	Moyenne à forte	Rose	Rouge rosé	Moyen	Moyenne à forte
Wonderful	États-Unis	Occitanie	fin octobre	Moyenne à forte	Rouge rosé	Rouge rosé	Moyen à gros	Faible à moyenne

### 2.2.1. Matériel végétal pour l'évaluation de l'impact des conditions de culture (chapitre 3)

#### 2.2.1.a. Variété

Pour cette étude, l'effet de la variété de grenade a été évalué avec les variétés Mollar de Elche et Provence, sélectionnées en raison de leur rendement et des propriétés organoleptiques de la première, et de la résilience aux périodes de gel de la seconde (figures 2.2 et 2.3). Les morphologies et les teneurs en ellagitannins des co-produits de ces deux variétés rapportées dans la littérature [286] indiquent des teneurs en métabolites probablement différentes entre ces deux variétés cultivées en France.

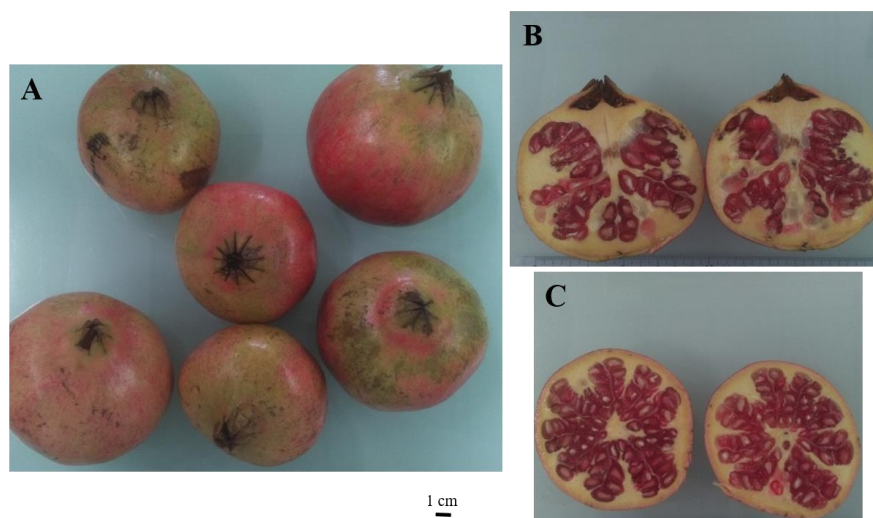


Figure 2.2 : Photo des grenades de la variété Mollar de Elche non traitées (localisation Du) à réception, vue d'ensemble (A), coupe longitudinale (B) et transversale (C).

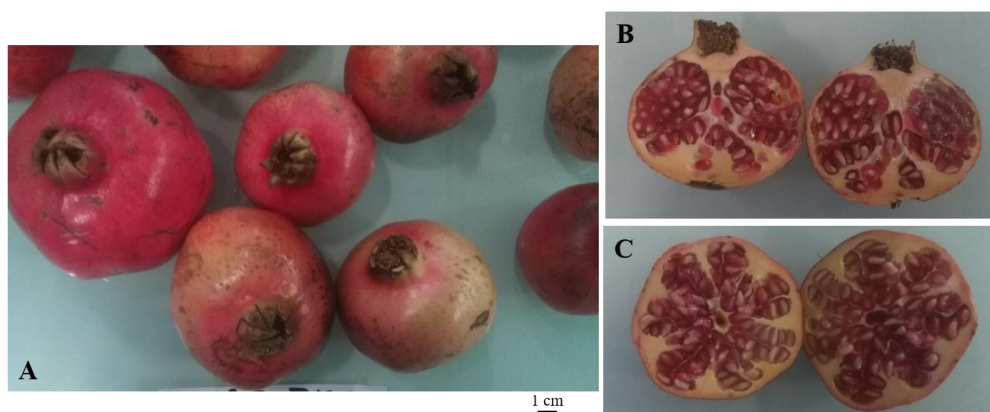


Figure 2.3 : Photo des grenades de la variété Provence non traitées (localisation Du) à réception, vue d'ensemble (A), coupe longitudinale (B) et transversale (C).

### 2.2.1.b. Conditions pédoclimatiques

Ensuite, l'évaluation de l'effet de la localisation des vergers a été conduite au moyen de six parcelles ("Be", "Co", "Du", "Pu", "Re" et "Sa") situées à travers l'Occitanie (figure 2.4), dans les communes "Bagnols-sur-Cèze" (30), "Pinet" (34), "Lunel" (34), "Béziers" (34), "Bouleternère" (66), "Bagnols-sur-Cèze" (30), et sujettes à un climat méditerranéen [287].

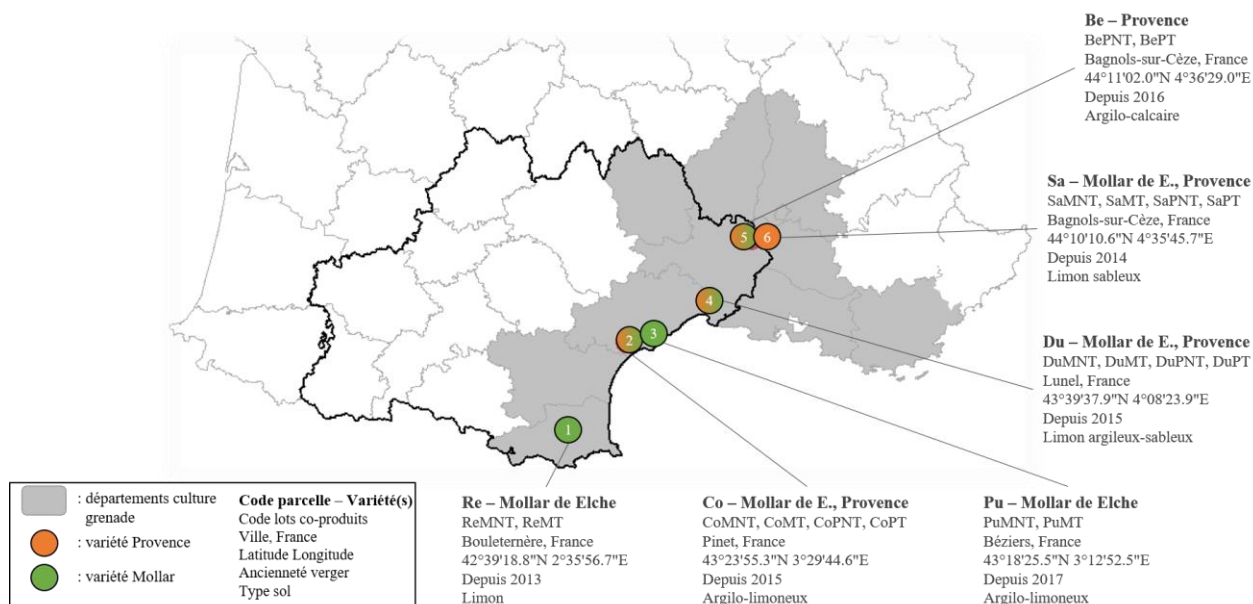


Figure 2.4 : Localisation et informations sur les parcelles de culture des grenades incluses dans l'étude.

La culture du grenadier sur les parcelles "Re" ; "Sa" ; "Co" et "Du" ; "Be" ; et "Pu" a débuté respectivement en 2013, 2014, 2015, 2016 et 2017. Les données climatiques (pluviométrie, températures moyennes, minimales et maximales) ont été fournies par la plateforme expérimentale SudExpé et sont issues des données Météo France pour les stations les plus proches des parcelles (Béziers pour "Co" et "Pu", Corbère les

Cabannes pour “Re”, Marsillargues pour “Du”, Pont St Esprit pour “Be” et “Sa”). Les données pédologiques ont également été fournies par SudExpé et correspondent aux textures suivantes : limon (“Re”), argilo-limoneux (“Co”, “Pu”), limon argileux-sableux (“Du”), limon sableux (“Sa”), et argilo-calcaire (“Be”). Enfin, la variété Provence a été cultivée sur les parcelles “Be”, “Co”, “Du” et “Sa”, alors que la variété Mollar de Elche a été cultivée sur les parcelles “Co”, “Du”, “Pu”, “Re” et “Sa”.

### 2.2.1.c. Itinéraire technique

Finalement, l’effet d’un traitement expérimental visant la diminution de l’éclatement des grenades a été évalué (tableau 2.2). Les essais ont été conduits par la plateforme expérimentale SudExpé, site de Marsillargues.

Tableau 2.2 : Extrait du compte rendu d'expérimentations 2019, programme GIMMS, SudExpé Site de Marsillargues (29/10/2019), X. Créte et C. Corblin.

Ville	Coordonnées	Code	Date	Heure	Température (°C)	Hygrométrie (%)
<b>Application 1</b>						
Lunel	43°39'37.9"N 4°08'23.9"E	Du	2019-06-03	10:00	21	79
Bagnols-sur-Cèze	44°11'02.0"N 4°36'29.0"E	Be	2019-05-31	08:20	19	76
Bagnols-sur-Cèze	44°10'10.6"N 4°35'45.7"E	Sa	2019-05-31	08:45	19	71
Pinet	43°23'55.3"N 3°29'44.6"E	Co	2019-05-31	11:00	25	62
Béziers	43°18'25.5"N 3°12'52.5"E	Pu	2019-05-31	11:40	26	59
Bouleternère	42°39'18.8"N 2°35'56.7"E	Re	2019-05-31	14:00	28	57
<b>Application 2</b>						
Lunel	43°39'37.9"N 4°08'23.9"E	Du	2019-06-13	14:40	27	57
Bagnols-sur-Cèze	44°11'02.0"N 4°36'29.0"E	Be	2019-06-12	09:00	17	80
Bagnols-sur-Cèze	44°10'10.6"N 4°35'45.7"E	Sa	2019-06-12	09:45	18	76
Pinet	43°23'55.3"N 3°29'44.6"E	Co	2019-06-12	12:50	23	66
Béziers	43°18'25.5"N 3°12'52.5"E	Pu	2019-06-12	13:50	23	66
Bouleternère	42°39'18.8"N 2°35'56.7"E	Re	2019-06-12	16:00	22.5	62
<b>Application 3</b>						
Lunel	43°39'37.9"N 4°08'23.9"E	Du	2019-06-26	08:00	23	92
Bagnols-sur-Cèze	44°11'02.0"N 4°36'29.0"E	Be	2019-06-26	09:30	26.5	84
Bagnols-sur-Cèze	44°10'10.6"N 4°35'45.7"E	Sa	2019-06-26	09:50	28	78
Pinet	43°23'55.3"N 3°29'44.6"E	Co	2019-06-26	11:50	33.5	60
Béziers	43°18'25.5"N 3°12'52.5"E	Pu	2019-06-26	12:35	35	59
Bouleternère	42°39'18.8"N 2°35'56.7"E	Re	2019-06-26	14:30	36.5	52

Le mois suivant la nouaison des fruits, c’est-à-dire le début du stade de développement des fruits après fécondation, le traitement foliaire (*Liquamag B<sup>+</sup>* et *Liquazinc 170S*, concentration finale des nutriments 16,5 et 306 mg/L, pour le bore et le zinc, respectivement) a été appliqué à l’aide d’un pulvérisateur à dos, type Solo (mouillage 600 L/Ha), sur les parcelles sélectionnées. Au total, trois applications du traitement ont été effectuées, à 15 jours d’intervalle (tableau 2.2). Ce traitement a été appliqué sur une partie des vergers de chaque variété. L’impact potentiel des nutriments (bore,

zinc) de ce traitement sur la composition des grenades et leurs co-produits a motivé l'intégration des lots de fruits traités dans l'étude.

Les grenadiers ont été plantés à la même densité de plantation (distances intra- et inter-rang 3 m x 5 m) et sont de gabarits similaires (3-4 m de hauteur) en raison de l'ancienneté des vergers, en moyenne de 4 ans en 2019, et de la croissance lente des grenadiers. L'irrigation a été mise en place par les producteurs selon leurs besoins locaux pour correspondre à une pluviométrie annuelle d'environ 500 mm d'eau par an.

### **2.2.1.d. Récolte des grenades et échantillonnage des co-produits**

Les grenades ont été récoltées selon le calendrier des producteurs, puis conservées à température ambiante ( $21,4 \pm 1,3$  °C) dans des contenants fermés jusqu'à l'échantillonnage des co-produits. Les parcelles "Co", "Pu" et "Re" ont été récoltées le 23/09/2019 puis les co-produits échantillonnés les 26 et 27/09/2019. La parcelle "Du" a été récoltée le 08/10/2019 et les co-produits échantillonnés le 9/10/2019. Les parcelles "Sa" et "Be" ont été récoltées le 09/10/2019 et les co-produits échantillonnés les 11 et 12/10/2019.

Les péricarpes et graines des fruits collectés ont été séparés manuellement. Les premiers ont été directement pesés, plongés dans l'azote liquide puis conservés à - 20 °C jusqu'à lyophilisation. Les graines ont été conservées moins de 48 heures en chambre froide (4,5 °C) avant d'être pressées. Le jus a été extrait à l'aide d'un extracteur de jus (*J 100 Ultra ROBOT COUPE, Montceau-en-Bourgogne, France*), puis le co-produit récupéré a été extrait une seconde fois avant d'être plongé dans l'azote liquide, et entreposé en chambre froide négative (- 20 °C) en attente de lyophilisation (lyophilisateur pilote 1,25 m<sup>2</sup> *CRYO RIVOIRE, Montpellier, France*) avec le programme suivant : départ à - 80 °C jusqu'à atteinte d'une température de 20 °C. Une fois secs, les co-produits ont été conservés dans des contenants hermétiques, puis broyés avec un broyeur à couteaux (*Pulverisette 19, FRITSCH, Idar-Oberstein, Allemagne*) sur successivement des grilles de diamètre 6, 2 et 1 mm.

Le tableau 2.3 ci-après résume la provenance des lots de co-produits obtenus *via* les conditions de cultures.

Tableau 2.3 : Co-produits générés par les grenades des variétés Mollar de Elche (M) et Provence (P) cultivées sur 6 parcelles différentes, avec (T) ou sans (NT) traitement contre l'éclatement.

Variété	Localisation	Traitement	Nombre fruits	Code Lot	
M	Co	Non	12	2019CoMNT	
		Oui	12	2019CoMT	
	Du	Non	18	2019DuMNT	
		Oui	18	2019DuMT	
	Pu	Non	6	2019PuMNT	
		Oui	12	2019PuMT	
	Re	Non	12	2019ReMNT	
		Oui	13	2019ReMT	
	Sa	Non	12	2019SaMNT	
		Oui	13	2019SaMT	
	P	Be	Non	12	2019BePNT
			Oui	12	2019BePT
Co		Non	12	2019CoPNT	
		Oui	12	2019CoPT	
Du		Non	25	2019DuPNT	
		Oui	25	2019DuPT	
Sa		Non	12	2019SaPNT	
		Oui	14	2019SaPT	

## 2.2.2. Matériel végétal pour l'évaluation de l'impact des conditions de conservation (chapitre 4)

### 2.2.2.a. Origine des grenades

Les grenades des variétés Mollar de Elche (n=202) et Valenciana (n=250), toutes deux cultivées dans la région Occitanie ont été fournies par la société partenaire SiBio! (figure 2.5). Au total, 192 et 240 grenades Mollar de Elche et Valenciana, respectivement, ont été réparties dans les différentes conditions de conservation décrites ci-après, et 10 fruits de chaque variété ont été caractérisés à réception pour servir de témoins (sans conservation).



Figure 2.5 : Grenades Mollar de Elche et Valenciana.

### 2.2.2.b. Méthodes de conservation

La conservation des grenades a été évaluée sur deux mois avec 12 conditions de conservation, présentées sur la figure 2.6, avec 16 et 20 fruits par modalité, pour les variétés Mollar de Elche et Valenciana, respectivement.

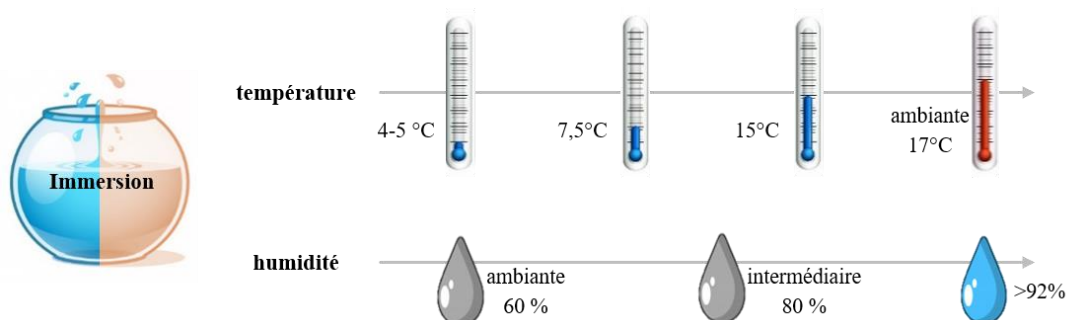


Figure 2.6 : Schéma récapitulatif des méthodes de conservation des grenades mises en place.

Les 12 conditions de conservation (S02-S13) sont présentées dans le tableau 2.4. Les paramètres étudiés sont la température, l'humidité relative et un traitement par immersion appliqué avant la conservation des grenades. Quatre modalités de température ont été sélectionnées : température ambiante (17 °C), moyenne (7,5 °C), et température de chambre froide (4-5 °C avec, ou non, une acclimatation à 15 °C pendant 10 jours). Deux modalités d'humidité relative ont été retenues : humidité

relative supérieure à 92 % et témoin négatif à humidité relative ambiante (60 %). Six types d'immersion ont été sélectionnés au vu de leur compatibilité avec le cahier des charges du label Agriculture Biologique : l'eau distillée, une solution de bicarbonate de sodium (10 g/L), et une solution d'*Aloe vera* (1 g/L) à froid (20 °C) ou à chaud (55 °C), ainsi qu'un témoin sans immersion.

Pour les conditions à une humidité relative supérieure à 92 %, les fruits ont été placés sur des grilles dans des bacs contenant de l'eau et fermés hermétiquement. La température et l'humidité ont été suivies avec des thermohygromètres (*EasyLog EL-USB-2-LCD*, *LASCAR ELECTRONICS*, *Salisbury, Royaume-Uni*).

Les températures et humidités relatives mesurées dans les conditions de conservation sont aussi présentées dans le tableau 2.4, et correspondent aux valeurs moyennes sur les 8 semaines de conservation. À la suite d'une panne d'enceinte hygroclimatique, les grenades conservées à 7,5 °C ont été placées dans un réfrigérateur, l'humidité relative ambiante mesurée a oscillé entre 65 et 89 %.

Les solutions d'*Aloe vera* et de bicarbonate de sodium ont été préparées dans de l'eau distillée à 1 et 10 g/L, respectivement, sous agitation. Elles ont ensuite été placées dans des bains marie à 20 ou 55 °C. Les grenades ont été immergées dans ces solutions pendant 5 minutes, puis séchées à l'air libre sur des grilles avant d'être stockées.

Tableau 2.4 : Conditions de conservation des grenades.

Condition	Code	Paramètres attendus		Paramètres réels		Immersion Type	T (°C)	Nombre grenades			
		T (°C)	RH (%)	T (°C)	RH (%)			0-4 sem		5-8 sem	
								M	V	M	V
Témoin sans stockage	S01	-	-	-	-	-	-	10	10	-	-
Témoin T et RH ambiantes	S02	17	60	17,1 ± 1,2	63 ± 7	-	-	16	20	8	10
Témoin T ambiante et RH>92%	S03	17	>92	17,1 ± 1,2	103 ± 1	-	-	16	20	8	10
Témoin chambre froide	S04	4-5	>80	3,7 ± 0,4	97 ± 3	-	-	16	20	8	10
Effet température 1 et RH>92%	S05	4-5	>92	4,3 ± 0,4	103 ± 2	-	-	16	20	8	10
Témoin sans immersion	S06	7,5	>92	7,1 ± 0,5	77 ± 12	-	-	16	20	8	10
Effet température 2 et RH>92%	S07	15 puis 4-5	>92	15,1 ± 0,3 puis 4,1 ± 0,4	99 ± 2 puis 104 ± 2	-	-	16	20	8	10
Immersion 1	S08	7,5	>92	7,1 ± 0,5	77 ± 12	Eau	20	16	20	8	10
Immersion 2	S09	7,5	>92	7,1 ± 0,5	77 ± 12	Eau	55	16	20	8	10
Immersion 3	S10	7,5	>92	7,1 ± 0,5	77 ± 12	Bicarbonate de sodium	20	16	20	8	10
Immersion 4	S11	7,5	>92	7,1 ± 0,5	77 ± 12	Bicarbonate de sodium	55	16	20	8	10
Immersion 5	S12	7,5	>92	7,1 ± 0,5	77 ± 12	<i>Aloe vera</i>	20	16	20	8	10
Immersion 6	S13	7,5	>92	7,1 ± 0,5	77 ± 12	<i>Aloe vera</i>	55	16	20	8	10

T : température, RH : humidité relative, M : Mollar, V : Valenciana, sem : semaine

### 2.2.2.c. Préparation des échantillons

Des lots de co-produits issus des grenades ont été échantillonnés avant le stockage (témoin) et après 4 et 8 semaines de conservation (12 conditions). Les facteurs étudiés sont la variété de grenade, la méthode (type d'immersion, température, humidité relative) et la durée de conservation. La combinaison de ces facteurs correspond à un lot de matière (ou un lot de co-produits), présentés dans le tableau 2.5.

Après 4 semaines de conservation, la moitié des grenades a été échantillonnée en co-produits soit 8 fruits Mollar de Elche et 10 fruits Valenciana. Le reste des grenades a été conservé 4 semaines supplémentaires (8 semaines) puis échantillonné. Les péricarpes ont tout d'abord été séparés manuellement, comme pour les lots de fruits du chapitre précédent, plongés dans l'azote liquide et conservés en chambre froide négative (-20 °C) jusqu'à lyophilisation. Les graines ont été conservées à 4,5 °C dans des contenants fermés jusqu'à l'extraction du jus, comme précédemment à l'aide d'un extracteur de jus (*J 100 Ultra ROBOT COUPE, Montceau-en-Bourgogne, France*) en deux extractions successives. Le co-produit solide d'extraction du jus a ensuite été immergé dans de l'azote liquide et conservé en chambre froide négative jusqu'à lyophilisation (lyophilisateur pilote 1,25 m<sup>2</sup> *CRYO RIVOIRE, Montpellier, France*). Le même programme de lyophilisation que pour les co-produits du chapitre précédent a été utilisé pour ces co-produits issus des fruits conservés. Après lyophilisation, les co-produits ont été broyés successivement sur des grilles de 6 et 1 mm avec un broyeur à couteaux (*Pulverisette type 15.302, FRITTSCH, Idar-Oberstein, Allemagne*), puis conservés dans des contenants fermés hermétiquement à température et humidité ambiante jusqu'à leur caractérisation.

Cinquante lots de co-produits ont ainsi été obtenus pour l'étude des 12 conditions de conservation et des témoins non conservés. Le codage des échantillons est présenté dans le tableau 2.5.

Tableau 2.5 : Codage des co-produits générés par les différentes conditions de conservations des grenades des variétés Mollar de Elche (M) et Valenciana (V).

Condition Nom	Code	Code Lot					
		0 sem		4 sem		8 sem	
		M	V	M	V	M	V
Témoin sans stockage	S01	AA	A			-	
Témoin T et RH ambiantes	S02			AB	B	AC	C
Témoin T ambiante et RH>92%	S03			AD	D	AE	E
Témoin chambre froide	S04			AF	F	AG	G
Effet température 1 et RH>92%	S05			AH	H	AI	I
Témoin sans immersion	S06			AJ	J	AK	K
Effet température 2 et RH>92%	S07			AL	L	AM	M
Immersion 1	S08		-	AN	N	AO	O
Immersion 2	S09			AP	P	AQ	Q
Immersion 3	S10			AR	R	AS	S
Immersion 4	S11			AT	T	AU	U
Immersion 5	S12			AV	V	AW	W
Immersion 6	S13			AX	X	AY	Y

T : température, RH : humidité relative, sem : semaine, M : Mollar de Elche, V : Valenciana.



### 2.2.3. Matériel végétal pour l'évaluation de l'impact des conditions de conditionnement (chapitre 5)

Les lots de co-produits (péricarpes et co-produits de pressage des graines) ont été obtenus dans le cadre d'une production industrielle de jus de grenades, à l'atelier de transformation de l'entreprise partenaire Si-Bio!. Ils sont issus principalement d'un mélange des variétés Wonderful, Mollar de Elche, Provence et Acco en 2019, et Wonderful, Mollar de Elche et Provence en 2021, toutes cultivées en Occitanie. Les mélanges de grenades ont été transformés sur une chaîne comprenant une égreneuse automatique (figure 2.7) séparant les péricarpes des graines (*Lugana, CMA, Mogliano, Italie*), et une presse à ruban (figure 2.8) pour l'extraction du jus (*EBP650, Voran, Pichl bei Wels, Autriche*).

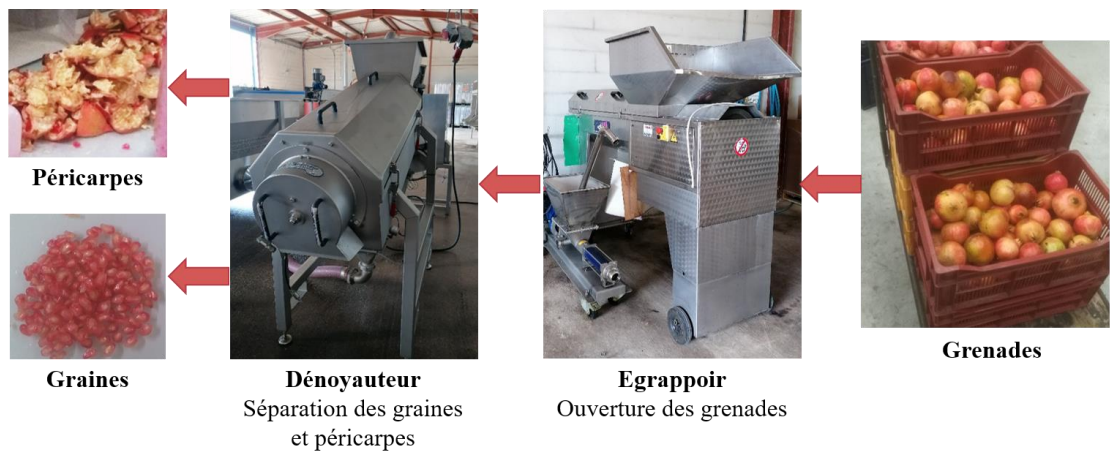


Figure 2.7 : Chaîne de transformation des grenades de l'atelier SiBio! : séparation des graines et péricarpes.

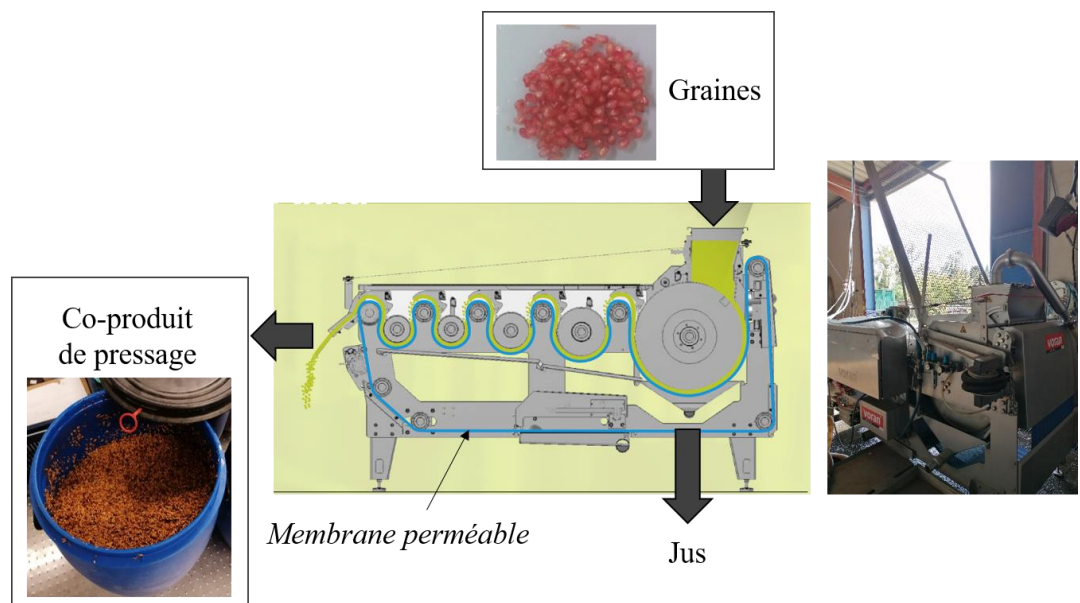


Figure 2.8 : Chaîne de transformation des grenades de l'atelier SiBio! : pressage des graines.

Dans les 24 heures suivant leur génération, les co-produits ont été conditionnés de plusieurs manières. Les co-produits de transformation de grenade obtenus en 2019 ont

été lyophilisés, séchés en étuve ventilée, ou fermentés (ensilés) pendant 1 à 8 semaines. En 2021, les co-produits de pressage des graines de grenade ont été séchés en étuve ventilée ou avec un sécheur à tapis en continu.

- **Lyophilisation**

La lyophilisation a été effectuée à l'aide d'un lyophilisateur pilote de 1,25 m<sup>2</sup> (*CRYO RIVOIRE, Montpellier, France*) avec une gamme de températures de - 80 °C à 20 °C.

- **Fermentation spontanée (ensilage)**

L'ensilage est le procédé de conservation des fourrages employé en agriculture, mais peut aussi être appelé fermentation spontanée. Les co-produits ont été ensilés par lots de 1 kg dans des sacs en plastique fermés hermétiquement et conservés à température ambiante (température moyenne : 17,1 ± 1,2 °C, maximale : 19,5 °C, minimale : 15,0 °C) dans l'obscurité pendant 1 à 8 semaines. A la fin de la période sélectionnée, les lots ont été placés dans de l'azote liquide puis congelés avant d'être lyophilisés selon les mêmes conditions que décrites précédemment.

- **Séchage par étuve ventilée**

Le séchage en étuve ventilée (figure 2.9) a été accompli dans une étuve pilote de 1 m<sup>3</sup> (*AMC-AMTC ex-MPC, Ruy, France*). Les co-produits ont été étalés sur chaque grille sur une épaisseur de 3 cm, puis séchés à la température désirée (40, 70, 100 et 150 °C) jusqu'à atteindre une teneur en eau inférieure à 15 %, soit une durée de 3 à 48 h.



Figure 2.9 : Déshydratation des co-produits de grenade avec une étuve ventilée.

- **Séchage par sécheur à tapis**

En 2021, un sécheur à tapis (*sécheur industriel 160x200 cm, CLEXTRAL, Firminy, France*) a été employé pour sécher les co-produits de pressage des

graines (figure 2.10). La matière est insérée au niveau de l'alimentation, puis convoyée sur un tapis perforé et soumise à un flux d'air chaud sec qui la traverse jusqu'à la zone de réception. Deux épaisseurs de matière ont été testées (1 ou 2 cm), pour quatre températures (70, 100, 130, ou 160 °C), à débits de circulation d'air entrant et sortant constants. Les co-produits ont été placés sur le tapis à vitesse variable, permettant d'ajuster le temps de séjour de ceux-ci sous l'air chaud. Le temps de séjour maximum étant de 900 s, selon la température choisie, les co-produits ont été placés dans le sécheur à plusieurs reprises jusqu'à atteindre la teneur en eau ou la teneur en matière sèche désirée.

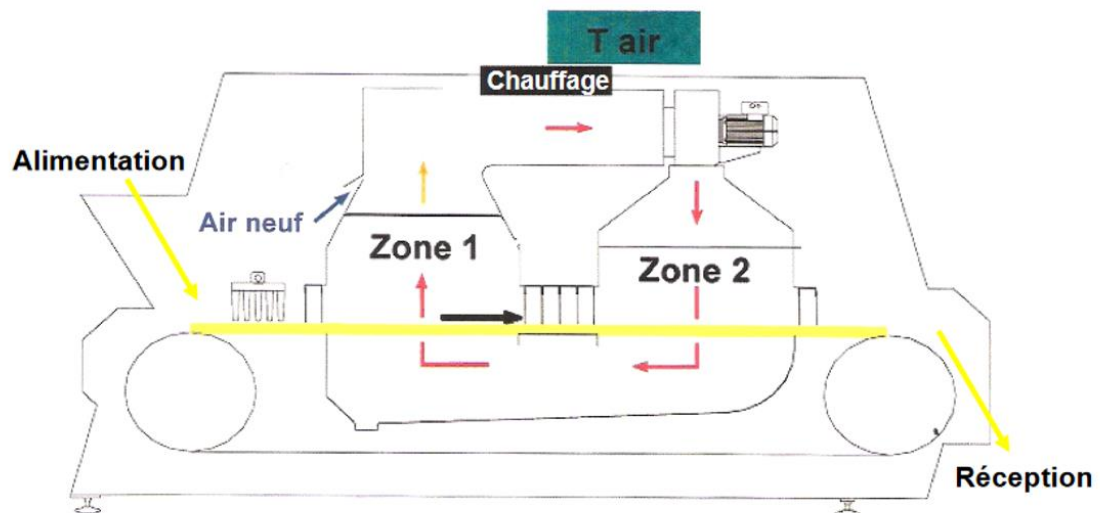


Figure 2.10 : Déshydratation des co-produits de pressage des graines de grenade avec un sécheur à tapis industriel en continu.

- **Broyage**

Les co-produits secs ont ensuite été broyés avec un broyeur à couteaux (*Pulverisette 19, FRITSCH, Idar-Oberstein, Allemagne* en 2019 et *MF10, IKA, Staufen, Allemagne* en 2021) à l'aide de grilles de 6, 2, puis 1 mm.

Le tableau 2.6 ci-dessous présente les différents conditionnements des 22 et 14 lots de co-produits obtenus respectivement en 2019 et 2021.

Tableau 2.6 : Lots de co-produits générés par les méthodes de conditionnement (lyophilisation, séchage, fermentation spontanée).

Code Lot	Péricarpe	Résidu	Ensilage (sem)	Type de séchage	T (°C)	Ep. (cm)	n
<b>Année: 2019</b>							
2019MeI40	X	X		étuve	40	3	3
2019MeI70	X	X		étuve	70	3	3
2019MeLYoph	X	X		lyophilisation	20	2	3
2019MeIS1	X	X	1	lyophilisation	20	2	3
2019MeIS2	X	X	2	lyophilisation	20	2	3
2019MeIS3	X	X	3	lyophilisation	20	2	3
2019MeIS4	X	X	4	lyophilisation	20	2	3
2019MeIS5	X	X	5	lyophilisation	20	2	3
2019MeIS6	X	X	6	lyophilisation	20	2	3
2019MeIS7	X	X	7	lyophilisation	20	2	3
2019MeIS8	X	X	8	lyophilisation	20	2	3
<b>Année: 2021</b>							
CON_1_100		X		continu	100	1	2
CON_1_130		X		continu	130	1	2
CON_1_70		X		continu	70	1	2
CON_2_100		X		continu	100	2	2
CON_2_130		X		continu	130	2	2
CON_2_160		X		continu	160	2	2
CON_2_70		X		continu	70	2	2
ETU_100_1		X		étuve	100	3	2
ETU_150_1		X		étuve	150	3	2
ETU_40_1		X		étuve	40	3	2
ETU_40_2		X		étuve	40	3	2
ETU_70_1		X		étuve	70	3	2
ETU_70_2		X		étuve	70	3	2
ETU_70_3		X		étuve	70	3	2

Résidu : Co-produit de pressage des graines, Ensilage (sem): Durée fermentation spontanée (semaine), T (°C) : Température séchage (°C), Ep. (cm) : Epaisseur matière (cm), n : nombre d'échantillons analysés.

### 2.3. Caractérisation physique et qualitative des fruits

Les grenades étudiées dans les chapitres 3 et 4 (impact des conditions de culture et de conservation, respectivement) ont été caractérisées selon leur masse, couleur, et la présence d'altérations visibles à leur surface (taches brunes d'origine physiologique ou microbienne, craquelures, fêlures).

- **Masse**

La masse des fruits a été mesurée sur une balance de précision (*PG5002-S 5, 1kg/0,00g, Mettler Toledo, Viroflay, France*). Pour les grenades employées dans les essais de conservation, la perte de masse relative ( $m_{rel,n}$ ) a été calculée à partir de la masse d'un fruit à une durée  $n$  ( $m_n$ ) et la masse du fruit à réception ( $m_0$ ) selon la formule ci-après. La masse des fruits a été mesurée 10 fois sur une grenade, puis une mesure par fruit analysé a été effectuée (écart-type de mesure :  $S_{n=10} = 0,01$  g, coefficient de variation :  $CV = 0,001$  %).

$$m_{rel,n} = \frac{m_n - m_0}{m_0}$$

Avec:

$m_{rel,n}$ : masse relative de la semaine  $n$  ( $0 < n < 8$ ), sans unité, arb.

$m_n$ : masse de la semaine  $n$  ( $0 < n < 8$ ), g

$m_0$ : masse initiale, g

- **Couleur**

La couleur des fruits a été mesurée à l'aide d'un colorimètre (*Chroma Meter CR-400/410, Konica Minolta, Tokyo, Japon*) dans l'espace de couleurs CIELAB ou  $L^*a^*b^*$  CIE 1976. Pour le suivi de la couleur des fruits au cours du temps (étude de la conservation des grenades), l'emplacement du colorimètre a été indiqué sur l'exocarpe et est donc resté constant pendant la durée de conservation. Les valeurs  $L^*$ ,  $a^*$  et  $b^*$  représentent respectivement la luminosité (de 0 à 100), la composante rouge-vert, et la composante jaune-bleu de la couleur ; elles sont sans unité. Les trois composantes permettent de définir une couleur dans l'espace CIE  $L^*a^*b^*$ , et la différence entre deux couleurs de grenades à 0 et  $n$  semaines de conservation,  $\Delta E_{0,n}$ , s'obtient par la formule ci-après. De même que pour la masse, la mesure des coordonnées  $L^*$ ,  $a^*$  et  $b^*$  a été répliquée 10 fois sur un fruit prélevé au hasard, puis une mesure par fruit a été effectuée (écart-type de mesure 1,0, 0,6, 0,4 et coefficients de variation 1,2, 1,7 et 1,5 % pour  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , respectivement).

$$\Delta E_{0,n} = \sqrt{(L_n^* - L_0^*)^2 + (a_n^* - a_0^*)^2 + (b_n^* - b_0^*)^2}$$

Avec:

$\Delta E_{0,n}$ : différence de couleur entre les semaines 0 et  $n$  ( $1 < n < 8$ ), sans unité

$L_n^*$ : coordonnée  $L^*$  de la semaine  $n$  ( $0 < n < 8$ ), sans unité

$a_n^*$ : coordonnée  $a^*$  de la semaine  $n$  ( $0 < n < 8$ ), sans unité

$b_n^*$ : coordonnée  $b^*$  de la semaine  $n$  ( $0 < n < 8$ ), sans unité

- **Altérations du péricarpe**

Le **taux d'éclatement** ( $\text{taux}_{\text{eclatement}}$ ), défini comme une fissure du péricarpe rendant les graines visibles (toutes les couches cellulaires altérées), a été calculé à partir du nombre de fruits éclatés ( $nb_e$ ) dans un lot comprenant  $N$  fruit à l'aide de la formule suivante :

$$\text{taux}_{\text{éclatement},n} = \frac{nb_{e,n}}{N} - \frac{nb_{e,0}}{N}$$

Avec:

$\text{taux}_{\text{éclatement},n}$ : taux d'éclatement de la semaine  $n$ ,  $0 < n < 8$ , sans unité

$nb_{e,n}$ : nombre de grenades éclatées de la semaine  $n$ ,  $0 < n < 8$ , sans unité

$nb_{e,0}$ : nombre de grenades éclatées de la semaine 0, sans unité

$N$ : nombre total de grenades, sans unité

Le **taux de craquement** ( $\text{taux}_{\text{craquement}}$ ), défini comme une fissure du péricarpe ne rendant pas les graines visibles (l'ensemble du péricarpe n'est pas altéré), a été calculé avec le nombre de fruits fissurés ( $nb_c$ ) dans un lot comprenant  $N$  fruits avec la formule suivante :

$$\text{taux}_{\text{craquement},n} = \frac{nb_{c,n}}{N} - \frac{nb_{c,0}}{N}$$

Avec:

$\text{taux}_{\text{craquement},n}$ : taux de craquement de la semaine  $n$ ,  $0 < n < 8$ , sans unité

$nb_{c,n}$ : nombre de grenades fissurées de la semaine  $n$ ,  $0 < n < 8$ , sans unité

$nb_{c,0}$ : nombre de grenades fissurées de la semaine 0, sans unité

$N$ : nombre total de grenades, sans unité

Le **taux d'altérations physiologique ou microbienne** ( $\text{taux}_{\text{physio-mo}}$ ) résulte d'une observation à l'œil nu de la présence de taches ou de points de couleur brune à noire ou de mycélium sur l'exocarpe, ou du noircissement du calice des fruits. La grande diversité des pathogènes des fruits et légumes, incluant la grenade, ont conduit à utiliser ce facteur qualitatif avec deux niveaux (présence ou absence d'altération). Ce taux a été calculé comme suit, avec  $nb_m$  le nombre de fruits atteints sur l'ensemble du lot  $N$ .

$$\text{taux}_{\text{physio-mo},n} = \frac{nb_{m,n}}{N} - \frac{nb_{m,0}}{N}$$

Avec:

$\text{taux}_{\text{physio-mo},n}$ : taux d'altération physiologique ou microbienne de la semaine  $n$ ,  $0 < n < 8$ , sans unité

$nb_{m,n}$ : nombre de grenades atteintes de la semaine  $n$ ,  $0 < n < 8$ , sans unité

$nb_{m,0}$ : nombre de grenades atteintes de la semaine 0, sans unité

$N$ : nombre total de grenades, sans unité

## 2.4. Caractérisation physico-chimique des co-produits

### 2.4.1. Teneur en matière sèche

La teneur en matière sèche (ms) des co-produits ( $n=2$  ou  $3$ ) a été obtenue par gravimétrie après un séchage jusqu'à masse constante dans une étuve ventilée (*UF260*, *MEMMERT*, *Schwabach*, *Allemagne*) à  $103^\circ\text{C}$  à l'aide de la formule ci-après, ou à l'aide d'une balance infrarouge (*MA 35*,  $25\text{g} / 0,000\text{g}$ , *Sartorius*, *Göttingen*, *Allemagne*) avec des prises d'essais entre  $0,2$  et  $1,0\text{g}$  donnant directement le taux de matière sèche (MS%) définit ci-dessous.

La teneur en matière sèche des co-produits en étuve ventilée a été réalisée en triplicats sur les 108 premières matières puis en duplicats pour un total de 165 matières

analysées, avec des répétitions si les coefficients de variation étaient supérieurs à 5 %. La teneur en matière sèche obtenue avec la balance infrarouge a été réalisée 47 fois en triplicats, avec un coefficient de variation moyen de 3 % ce qui a validé une diminution du nombre de réplicats d'analyse.

$$ms = \frac{m_{sec} - m_0}{m_{humide} - m_0}$$

Avec:

*ms*: matière sèche, g/g

*m<sub>sec</sub>*: masse après deshydratation, g

*m<sub>humide</sub>*: masse initiale, g

*m<sub>0</sub>*: tare, g

$$MS\% = ms \times 100$$

Avec:

*MS%*: taux de matière sèche, % g/g

*ms*: teneur en matière sèche, g/g

## 2.4.2. Étude des composés phénoliques de péricarpes

### 2.4.2.a. Extraction

L'extraction des polyphénols de péricarpes de grenade séchés a été effectuée en triplicats par macération dans le méthanol, avec un ratio solide-liquide de 1/30 (m/v, g/mL), une agitation entre 800 et 1 200 rpm, et à 20 °C (armoie thermostatique *TS 608, WTW Xylem Group, Letchworth, Royaume-Uni*). Une durée d'extraction de 60 minutes a été choisie suivant les résultats préliminaires d'une cinétique d'extraction entre 30 et 150 minutes. Après macération, les extraits ont été filtrés à 0,45 µm avec un filtre en polytétrafluoroéthylène (PTFE) et conservés à - 20 °C jusqu'à l'analyse.

### 2.4.2.b. Analyse des extraits

#### 2.4.2.b.i. Rendement d'extraction

La concentration massique des extraits a été obtenue après séchage en étuve ventilée jusqu'à masse constante d'un volume connu d'extrait (n=3), et calculée comme suit :

$$Cm = \frac{m_{sec} - m_0}{V}$$

Avec:

*Cm*: concentration massique, g/L

*m<sub>sec</sub>*: masse après deshydratation, g

*m<sub>0</sub>*: tare, g

*V*: volume prélevé, L

La concentration massique exprimée en matière sèche des extraits méthanoliques a été réalisée en triplicats pour 268 extraits sur 270, pour un coefficient de variation maximal inférieur à 5 %.

Le rendement d'extraction ( $rdt_{meoh}$ ) a ensuite été calculé à partir de la concentration massique des extraits comme suit.

$$rdt_{meoh} = \frac{Cm \times V_{extraction}}{m \times ms} \times 100$$

Avec:

$rdt_{meoh}$ : rendement d'extraction, g/100g ms

$Cm$ : concentration massique de l'extrait, g/L

$V_{extraction}$ : volume d'extraction, L

$m$ : masse de matière extraite, g

$ms$ : teneur en matière sèche, g/g

#### 2.4.2.b.ii. Teneur en polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux a été obtenue avec une version adaptée en micro-plaque 96 puits [288] de la méthode de Singleton et Rossi [289]. Le dosage implique la réduction en milieu alcalin d'un complexe jaune d'acide phosphotungstique-phosphomolybdique (réactif de Folin-Ciocalteu) par les polyphénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène [290], dont l'absorbance maximale se situe entre 700 et 800 nm. L'intensité de la coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

Les extraits ont été dilués ( $n=2$  ou  $3$ ) entre 100 et 200 fois dans un mélange méthanol/eau ultrapure (80 : 20) pour obtenir une absorbance finale comprise entre 0,2 et 0,7, et une gamme étalon en milieu méthanol/eau ultrapure (80 : 20) avec plus de 5 points (concentrations 6 à 125 mg/L) a été réalisée avec l'acide gallique comme standard. Les échantillons dilués ou le standard (20  $\mu$ L) ont été placés dans 3 ou 4 puits de la micro-plaque, puis 10  $\mu$ L de réactif de Folin et 170  $\mu$ L de carbonate de sodium (2,36 % g/mL, dilué dans de l'eau distillée) ont été ajoutés. La plaque a été agitée (500 rotations par minute rpm, double orbital, 10 s) avant une incubation de 45 minutes à 45 °C dans le lecteur (*Spectro Star Nano, BMG LABTECH, Champigny sur Marne, France*), puis après une seconde agitation (500 rpm, double orbital, 10 s) l'absorbance de chaque puit a été mesurée à une longueur d'onde de 760 nm.

Tenant compte des différentes dilutions ( $n=2$  ou  $3$ ) et des répétitions d'analyse ( $n=3$  ou  $4$ ), entre 9 et 12 lectures de valeurs d'absorbance ont été réalisées par extrait.

L'acide gallique a été utilisé comme étalon externe, et la droite d'étalonnage tracée avec la concentration en fonction de l'absorbance mesurée, corrigée avec la valeur d'absorbance du témoin selon l'équation suivante :

$$A_{\text{puit}} - A_{\text{blanc}} = a \times C + b$$

Avec:

$C$ : concentration en acide gallique, g/L

$A_{\text{puit}}$ : absorbance de l'étalon

$A_{\text{blanc}}$ : absorbance du témoins

$a$ : pente de la droite d'étalonnage

$b$ : ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage



Les paramètres des 90 étalonnages effectués sont donnés en Annexe. L'étalonnage avec l'acide gallique a permis de déduire la concentration en polyphénols totaux (g équivalent acide gallique eag/L) des extraits avec l'équation suivante :

$$C_{pp,extrait} = \frac{A_{puit} - A_{blanc} - b}{a} \times \frac{1}{FD} \times \frac{V_{puit}}{V_{echantillon}}$$

Avec:

$C_{pp,extrait}$ : concentration en polyphénols totaux de l'extrait, g eag/L

$A_{puit}$ : absorbance de l'extrait

$A_{blanc}$ : absorbance du témoins

$a$ : pente de la droite d'étalonnage

$b$ : ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage

$FD$ : facteur de dilution de l'extrait

$V_{echantillon}$ : volume de l'échantillon dilué, L

$V_{puit}$ : volume total du puit, L

La teneur en polyphénols totaux des péricarpes (TPC, mg eag/g ms) a été calculée à partir de la concentration en polyphénols totaux de la manière suivante :

$$TPC = \frac{C_{pp,extrait} \times V_{extraction}}{m \times ms} \times 1000$$

Avec:

$TPC$ : teneur en polyphénols totaux de la matière sèche, mg eag/g ms

$C_{pp,extrait}$ : concentration en polyphénols totaux de l'extrait, g eag/L

$V_{extraction}$ : volume d'extraction, L

$m$ : masse extraite, g

$ms$ : teneur en matière sèche, g/g ms

#### 2.4.2.b.iii. Quantification des composés par chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP)

Les ellagitannins punicalagine et punicaline, ainsi que l'acide ellagique ont été quantifiés par chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP). L'analyse CLHP a été conduite avec un système Dionex Ultimate3000 avec un détecteur à barrette de diode (DAD) DAD-3000 aux longueurs d'ondes comprises entre 200 et 600 nm (Dionex, Thermo Fisher Corporation, Waltham, Etats-Unis). La colonne Kinetex Biphenyl 150x2,1x2,6, 100A (Phenomenex, Torrance, Etats-Unis) a été maintenue à 40 °C durant l'analyse. Un volume d'injection de 10 µL et un débit de 0,3 mL.min<sup>-1</sup> ont été sélectionnés. Le gradient d'éluants permettant la séparation a été développé à partir d'eau ultrapure (0,1 % acide formique) et de méthanol (0,1 % acide formique), nommés respectivement éluants A et B, de la manière suivante : 0-6,5 min 2 % B, 11-21 min 10 % B, 25-35 min 30 % B, 37-42 min 40 % B, 47-52 min 98 % B, et 56-60 min 2 % B.

La longueur d'onde de 254 nm a été choisie pour la quantification des polyphénols, et les chromatogrammes ont été traités sur le logiciel Chromeleon version 6.8 (Dionex, Thermo Fisher Corporation, Waltham, Etats-Unis). Les droites d'étalonnage externe ont été obtenues à 254 nm à partir des trois polyphénols aux concentrations suivantes : punicalagine α+β 0,8-109 mg/L, punicaline α+β 0,8-100 mg/L et acide ellagique 0,4-30 mg/L (4 points minimum). Les limites de détection et de quantification des trois composés sont données en Annexe. Ces polyphénols ont été identifiés dans les extraits

par comparaison des temps de rétention et des spectres UV-visible avec les standards. Les teneurs en punicalagine, punicaline et acide ellagique des péricarpes (mg/g ms) ont été calculées de la manière suivante :

$$T_{mol} = \frac{A - A_{blanc} - b}{a} \times \frac{1}{FD} \times \frac{V_{extraction}}{m \times ms} \times 1000$$

Avec:

$T_{mol}$ : teneur en molécule de la matière, mg/g ms

$A$ : absorbance de l'extrait

$A_{blanc}$ : absorbance du témoins

$a$ : pente de la droite d'étalonnage de la molécule

$b$ : ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage de la molécule

$FD$ : facteur de dilution de l'extrait

$V_{extraction}$ : volume d'extraction, L

$m$ : masse extraite, g

$ms$ : teneur en matière sèche, g/g ms

### 2.4.3. Étude des acides gras issus des co-produits de pressage des graines

#### 2.4.3.a. Extraction de l'huile

L'huile contenue dans les co-produits de pressage des graines a été extraite à température ambiante avec 15 mL de cyclohexane à un ratio solide-liquide de 1/15 (g/mL). Le mélange a été agité avec un agitateur orbital pendant 5 secondes, puis centrifugé (6K16, SIGMA, Osterode am Harz, Allemagne) pendant 10 minutes à 18 000 g. Le surnageant a ensuite été filtré sur papier Whatman n°1 et sulfate de sodium. Le résidu d'extraction a été extrait deux autres fois selon ce procédé, et les surnageants rassemblés pour un volume total d'environ 45 mL. Le choix du nombre d'extraction est donné en Annexe. L'extrait a ensuite été évaporé sous vide avec un évaporateur multi-canaux (Multivapor, Büchi, Villebon sur Yvette, France), puis l'huile séchée en étuve ventilée (60 °C) jusqu'à masse constante pour obtenir la teneur et le rendement en huile des co-produits de pressage des graines, respectivement  $T_{huile}$  et  $rdt_{huile}$  dont les calculs sont détaillés ci-après.

$$T_{huile} = \frac{m_{sec} - m_{tare}}{m \times ms}$$

Avec:

$T_{huile}$ : teneur en huile de la matière sèche, g/g ms

$m_{sec}$ : masse sèche de l'huile, g

$m_{tare}$ : tare, g

$m$ : matière extraite, g

$ms$ : teneur en matière sèche de la matière, g/gms

$$rdt_{huile} = T_{huile} \times 100$$

Avec:

$rdt_{huile}$ : rendement en huile de la matière sèche, g/100g ms

$T_{huile}$ : teneur en huile de la matière sèche, g/g ms

### 2.4.3.b. Analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse

Le profil d'acides gras des co-produits de pressage des graines a été obtenu par chromatographie en phase gazeuse (CPG) après leur extraction et leur transformation en esters méthyliques d'acide gras (FAMES). Les co-produits de pressage des graines (0,6 g) et 5 mL de méthyl *tert*-butyl éther (TBME) ont été agités avec un agitateur orbital, puis l'extrait filtré (filtre PTFE, 0,45 µm). Le réactif de méthylation (hydroxyde de triméthylsulfonium, TMSH, 30 µL) a ensuite été mélangé à 170 µL de filtrat.

L'analyse en CPG a été effectuée sur un système Varian 3900 FAME (Agilent Technology, Santa Clara, Etats-Unis) équipé d'une colonne CP Select CB column 50 mx0,25 mmx0,25 µm (Agilent Technology, Santa Clara, Etats-Unis) et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) à 360°C. Un volume d'injection de 1 µL a été choisi et configuré en mode *split* (1/100). L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur à un débit de 1,2 mL.min<sup>-1</sup>, et la séparation effectuée avec une température du four de 185 °C pendant 40 min, puis une augmentation de 15 °C.min<sup>-1</sup> jusqu'à 250 °C et enfin un maintien à cette température pendant 11 min.

Les acides gras ont été identifiés par comparaison de leurs temps de rétention avec un mélange de standards et des huiles commerciales (figure 2.11) de grenade (*Punica granatum*), tung (*Vernicia* sp.) et catalpa (*Catalpa bignonioides*) dont les FAMES ont été préparés selon la même procédure. Les chromatogrammes ont été traités avec le logiciel Star Workstation v6.41 (Varian Inc. - Agilent, Santa Clara, Etats-Unis), et les acides gras identifiés quantifiés en aire relative (% rel.) de l'ensemble des acides gras. La répétabilité de la méthode est donnée en Annexe.

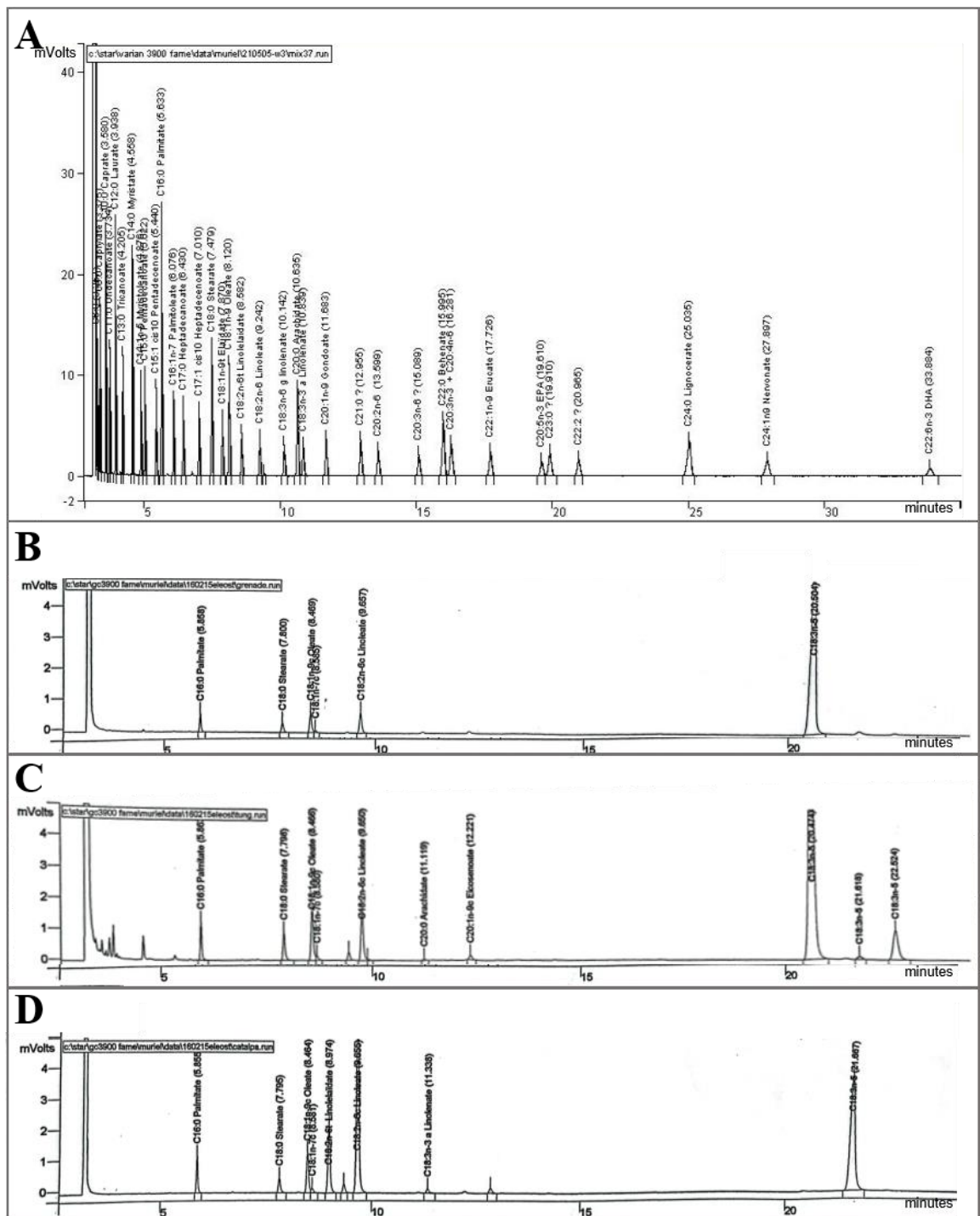


Figure 2.11 : Profil d'acides gras des standards "Mix 37" (A) et des huiles de grenade (B), tung (C) et catalpa (D) commerciales.

## 2.5. Analyse des données

Après un prétraitement par les logiciels des systèmes analytiques notamment pour l'intégration des pics chromatographiques, l'ensemble des données a été traité sur le logiciel RStudio version 2022.7.2.57 [291] et le langage R version 4.2.2 (2022-10-31) [292].

Les données cartographiques ont été générées avec les packages “*sf*”, et “*ggmap*”, les graphiques avec “*ggplot2*”, et les statistiques descriptives ont été effectuées à l'aide des packages “*base*”, “*tidyverse*” et “*qwraps2*”. Les points potentiellement aberrants ont été détectés par boîte à moustache et intervalles interquartiles avec le package “*outliers*”. Les statistiques inférentielles détaillées ci-après dans un ordre chronologique d'emploi ont été menées avec les packages précités et “*rstatix*”, “*agricolae*”, “*multcomp*” (ANOVA et post-hoc), “*FactoMineR*”, “*FactoExtra*”, “*missMDA*” (ACP), “*corrplot*” (corrélation).

- **Analyse de la variance (ANOVA) à un facteur**

L'analyse de la variance (ANOVA) à un facteur a été employée pour la comparaison des groupes d'échantillons de co-produits, et évaluer la présence d'au moins un groupe différent des autres. Pour les échantillons des itinéraires de culture, un groupe correspond à une variété, une localisation et la présence ou absence de traitement. Pour les échantillons des grenades conservées, un groupe correspond à une variété, une condition de conservation et une durée de conservation. Pour les échantillons de co-produits conditionnés, un groupe correspond à une méthode de conditionnement, une durée d'ensilage et une température de séchage. La différence entre les échantillons a été établie sur les variables mesurées dans ces travaux, c'est-à-dire les rendements d'extraction ou les teneurs en composés ciblés. Le grand nombre de variables étudiées a nécessité la correction des  $p$  valeurs obtenues de l'ANOVA, et la méthode de Holm a été choisie car assez conservative, c'est-à-dire qu'elle limite les chances de faux positif (conclusion erronée d'une différence significative entre deux groupes), et adaptée à nos objectifs de mettre en valeur les paramètres les plus influents [293]. Lorsqu'un groupe d'échantillon au moins était statistiquement différent des autres, un test post-hoc a été réalisé pour les comparaisons par paires entre les groupes. Le test HSD (différence significative honnête, “*Honest Significant Difference*”) de Tukey a été choisi car considéré comme conservatif. Les hypothèses de normalité et homoscedasticité de l'analyse de la variance ont été validées graphiquement avec les diagrammes quantile-quantile (Q-Q plot) et des valeurs résiduelles en fonction des valeurs ajustées, respectivement.

- **Exploration multidimensionnelle**

L'analyse en composante principale (ACP) a été utilisée pour observer l'effet des facteurs étudiés sur l'ensemble des variables mesurées (rendement d'extraction, teneur en composés d'intérêt). L'ACP permet de réduire un jeu de données multidimensionnel en combinant linéairement les variables étudiées influençant le plus les échantillons (i.e. maximisant la variance entre échantillons) pour créer de nouvelles variables. Autrement dit, l'ACP génère de nouvelles variables à partir des variables initiales, et ces nouvelles variables permettent de représenter les échantillons de manière à maximiser leurs différences. Ainsi, des groupes d'échantillons peuvent se

distinguer des autres, et en intégrant au graphique les facteurs étudiés, des tendances peuvent apparaître. Par exemple, les facteurs sélectionnés pour les grenades issues des itinéraires de culture sont la variété de grenade, la localisation de production, le traitement foliaire.

- **Analyse des relations entre variables**

L'étude des relations entre les variables a permis d'établir l'intensité et le sens d'une corrélation inter-variables. La méthode de corrélation de Pearson a été utilisée car les variables étudiées sont continues, et permet de détecter une relation linéaire entre deux variables.

- **Analyse de la variance (ANOVA) à plusieurs facteurs**

Les effets des facteurs étudiés pour les variables les plus importantes ont été approfondis avec une ANOVA à 2 ou 3 facteurs. Cette méthode permet à la fois de définir les effets globaux mais aussi la présence d'une interaction entre les facteurs. Contrairement à l'ANOVA à un facteur présentée précédemment, les échantillons ne sont plus classés par groupe, mais un niveau leur est attribué pour chaque facteur. Par exemple, pour les co-produits de grenades issues d'itinéraires de culture (chapitre 3), le facteur "variété" a deux niveaux ("Provence" et "Mollar de Elche"), le facteur "localisation" six niveaux ("Be", "Co", "Du", "Pu", "Re", "Sa") et le facteur traitement deux niveaux ("Traité" et "Non traité"). L'ANOVA avec ces trois facteurs permet de distinguer les effets de la variété, de la localisation et du traitement sur une variable étudiée, en tenant compte de l'interaction entre les trois facteurs. Cette analyse permet ainsi de détecter plus finement la significativité des facteurs en tenant compte de leurs différents niveaux et interactions. Lorsque l'effet significatif d'un facteur a été observé, des comparaisons par paires entre les différents niveaux de ce facteur ont été effectuées, et les moyennes marginales estimées ("*estimated marginal means*"). Ces moyennes permettent ensuite de calculer les différences significatives de la variable étudiée entre les niveaux du facteur. Autrement dit, on obtient la valeur de la différence entre deux niveaux du facteur.

- **Analyse de la variance (ANOVA) à deux facteurs, données appariées**

Dans le cas des séries de données temporelles, les effets du temps et d'un autre facteur ont été déterminés à l'aide d'une ANOVA mixte à 2 facteurs, c'est-à-dire une ANOVA sur mesures répétées (facteur intra-sujet) et placées dans des catégories indépendantes (facteur inter-sujet). Pour simplifier le traitement et l'interprétation des données obtenues lors de la conservation des grenades (chapitre 4), cette méthode a été employée pour évaluer les effets et interactions entre la durée de conservation (facteur "temps") et la condition de conservation des grenades. Le jeu de données a donc été séparé par variété et par durée totale de conservation (4 semaines ou 8 semaines), et les sous-jeux de données analysés séparément. Par la suite, lorsqu'un effet significatif a été détecté, des comparaisons par paires ont été effectuées, dans un premier temps, pour juger de l'évolution de la grandeur au cours du temps, donc de l'effet du facteur intra-sujet et, dans un second temps, pour comparer l'influence de la condition de stockage et donc juger de l'effet du facteur inter-sujet. Dans le cas d'une interaction significative entre les effets des deux facteurs, les comparaisons par paires ont été effectuées à chaque niveau du deuxième facteur étudié.



**3. ÉTUDE DE L'IMPACT DES  
CONDITIONS DE CULTURE DES  
GRENADES SUR LES COMPOSES A  
VALEUR AJOUTEE DE LEURS CO-  
PRODUITS**





L'amélioration de la qualité et du rendement de production des grenades autour du monde a révélé l'importance des conditions de culture sur les composés des parties comestibles et aussi non comestibles de la grenade (chapitre 1). Les facteurs principaux décrits sont la variété de grenade et les conditions environnementales. Ces connaissances sont encore limitées sur les grenades françaises du fait de l'émergence récente des exploitations de grenadiers en France. Les travaux présentés dans ce chapitre visent à explorer les liens entre les conditions de culture actuelles, les variétés implantées et la composition chimique des co-produits de grenades en tenant compte de la diversité environnementale du sud de la France.

Ce chapitre porte donc sur l'étude de l'influence de trois facteurs, la variété, la localisation des parcelles et le traitement des grenades au champ, sur les teneurs en composés à valeur ajoutée que contiennent leur co-produits de pressage. Les conditions opératoires ainsi que le matériel végétal utilisés sont développés dans le chapitre 2. Dans un premier temps, les grenades seront comparées qualitativement par leur masse, leur couleur (système CIEL\*a\*b\*), et les proportions de co-produits qu'elles contiennent. Seront ensuite présentées les caractéristiques chimiques (teneurs en polyphénols et lipides des péricarpes et co-produits de pressage des graines, respectivement) dans chacun des 36 lots de co-produits. Enfin, les variations de ces teneurs suivant les trois facteurs sélectionnés (variété, localisation, traitement) sont discutées.

### **3.1. Caractérisation qualitative des grenades et de leurs co-produits**

#### **3.1.1. Caractéristiques variétales**

Les lots de grenades étudiés sont présentés sur la figure 3.1.

## MOLLAR DE ELCHE



## PROVENCE



Figure 3.1 : Photos des lots de grenades issus des itinéraires de culture par variété (Mollar de Elche ou Provence), localisation des parcelles (Be, Co, Du, Pu, Re, Sa) et traitement contre éclatement (Non traité, Traité).

La masse des grenades non traitées (figure 3.2-A) est en moyenne de  $245,0 \pm 34,1$  et  $256,1 \pm 38,7$  g pour Mollar de Elche et Provence, respectivement. Elle n'est pas significativement différente entre les deux variétés de grenade ( $p > 0,05$ ). L'écart-type important entre ces masses montre une dispersion élevée des valeurs, ce qui est reconnu dans le domaine du vivant comme résultant de la variabilité génétique et des facteurs environnementaux, conduisant à des phénotypes différents. Une étude sur six variétés de grenades cultivées sur plusieurs parcelles en Espagne [294] a en effet montré que la masse de la variété Mollar de Elche est en moyenne de 325 g et comprise entre 125 et 613 g, et les 5 autres variétés ont des masses moyennes entre 147 et 824 g. A notre connaissance, il n'y a pas eu d'étude sur les caractéristiques morphologiques de Provence à ce jour. D'autres études portant sur de nombreuses variétés (26) ou prélèvement sauvages (204) de grenades trouvées en Italie [189], Iran [45], et Tunisie [295] font aussi état d'une variabilité importante de la masse des grenades en fonction de la variété. Ces phénomènes expliquent l'écart entre la masse moyenne de Mollar de Elche dans cette étude (245 g) et celle de la littérature (325 g).

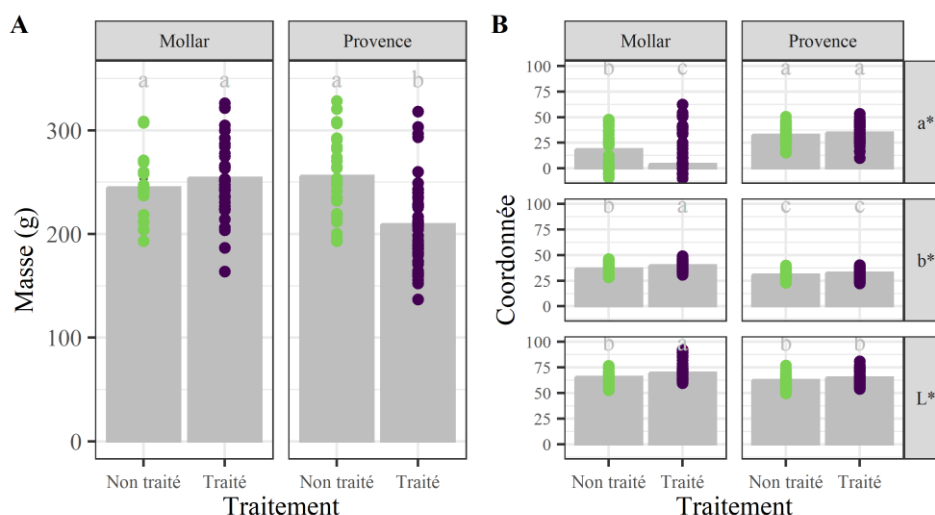


Figure 3.2 : Évolution de la masse et des coordonnées de l'espace de couleur CIEL\*a\*b\* des grenades en fonction de la variété et du traitement. Chaque fruit est représenté par un point pour la variété Mollar de Elche non traitée ( $n=60$ ), traitée ( $n=68$ ) et pour la variété Provence non traitée ( $n=61$ ) et traitée ( $n=63$ ).

Concernant leur couleur, les grenades Mollar de Elche semblent jaune-rouge avec une composante verte pour certaines, alors que les grenades Provence sont roses avec beaucoup moins de jaune (figure 3.1).

Ces couleurs, traduites dans l'espace colorimétrique CIELAB, correspondent à une luminance  $L^*$  de  $65,5 \pm 6,8$  et  $62,5 \pm 6,2$ , une composante chromatique  $a^*$  de  $18,7 \pm 18,7$  et  $32,6 \pm 8,3$ , et une composante chromatique  $b^*$  de  $36,7 \pm 5,9$  et  $30,9 \pm 4,3$ , en moyenne pour les lots non traités de Mollar de Elche et Provence, respectivement (figure 3.2-B). La luminance est équivalente entre les deux variétés ( $p > 0,05$ ), alors que Provence présente une composante  $a^*$  significativement plus élevée ( $p < 0,05$ ) et une composante  $b^*$  significativement plus faible ( $p < 0,05$ ). Par conséquent, la clarté des deux variétés est semblable alors que Provence est plus rouge, et Mollar de Elche plus verte et jaune. Certaines valeurs de la coordonnée  $a^*$  proches

de 0 ou négatives semblent cependant montrer la présence potentielle de grenades immatures dans le lot de la localisation “Sa”. Manera et al. [296] et Munera et al. [210] ont suivi le développement des grenades Mollar de Elche et ont en effet conclu que les fruits immatures de cette variété sont de couleur verte. Les gelées de l’année 2019 dans le sud de la France ont conduit à une perte non négligeable des premiers bourgeons des grenadiers, les fruits se sont donc développés plus tardivement ce qui a pu conduire à une plus grande proportion de grenades immatures dans certains vergers lors de la récolte. Une autre explication pouvant mener à de telles différences est le climat local, notamment la température ambiante durant le développement des fruits qui a déjà été corrélée positivement avec la couleur des grenades Mollar de Elche [297].

Dans la littérature, l’évolution de la couleur des grenades en fonction des conditions de culture est évaluée avec des échelles de couleur subjectives [295], avec les coordonnées CIELAB [207,210,297,298], ou avec des grandeurs calculées à partir des coordonnées de l’espace CIELAB, la chroma  $C^*_{ab}$  et l’angle de teinte  $h_{ab}$  [189,208,299]. Tous les paramètres de couleur de Mollar de Elche sont homogènes avec ceux de la littérature (tableau 3.1). De plus, les études concordent toutes sur l’influence significative de la variété sur la couleur des fruits, ce qui explique les variations observées entre Mollar de Elche et Provence.

$$C^*_{ab} = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2}$$

$$h_{ab} = \arctan(b^*/a^*)$$

Avec:

$C^*_{ab}$ : chroma CIELAB  
 $h_{ab}$ : angle de teinte CIELAB, rad  
 $a^*, b^*$ : coordonnées  $a^*, b^*$  CIELAB

Tableau 3.1 : Comparaison de la couleur des grenades Mollar de Elche avec celles de la littérature.  $L^*$  : clarté CIELAB,  $a^*$  et  $b^*$  : coordonnées CIELAB,  $C^*$  : chroma CIELAB,  $h$  : angle de teinte CIELAB.

Variété	n	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C^*$	$h$ (°)	Référence
Mollar de Elche	48	65.5	18.6	36.6	45.1	34.9	
Mollar de Elche	24	64.9	22.4	44.9	50.2	63.5	[298]
Mollar de Elche	48	65.8	12.7	42.4	44.4	73.5	[297]
Mollar de Elche	20	64			39	52	[208]
Mollar de Elche	30	53	20	25	32	51.3	[210]

n : nombre de fruits,  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  : composantes de clarté, et chromatiques de l’espace colorimétrique CIEL\* $a^*b^*$ ,  $C^*$  : chroma,  $h$  : angle de teinte.

### 3.1.2. Effets du traitement sur la masse et la couleur des fruits

Les grenades Mollar de Elche ont en moyenne sur les 5 parcelles étudiées un taux d’éclatement de 8,6 et 9,0 % pour les lots non traités et traités, respectivement (tableau 3.2). Celui des grenades Provence est de 8,5 et 5,5 % pour les lots non traités et traités, respectivement. Ces résultats indiquent une absence d’effet du traitement foliaire sur l’éclatement ( $p < 0,05$ ) qui est en moyenne de 7,8 % pour l’ensemble des grenades, 6,9 % pour la variété Provence et 8,8 % pour Mollar de Elche.

Tableau 3.2 : Effet du traitement foliaire sur l'éclatement des grenades Provence et Mollar de Elche. Le taux d'éclatement de Provence non traitée ( $n=1394$ ) ou traitée ( $n=1308$ ) a été évalué à partir des grenades des parcelles Be, Co, Du et Sa, et celui de Mollar de Elche non traitée ( $n=1512$ ) et traitée ( $n=1504$ ) a été obtenu avec des grenades des parcelles Co, Du, Pu, Re et Sa. Extrait du compte rendu d'expérimentations 2019, programme GIMMS, SudExpé Site de Marsillargues (29/10/2019), X. Crété et C. Corblin.

Variété	Témoins non traité	Traité	p	Significativité
Provence	8,46	5,32	0,1	ns
Mollar de Elche	8,64	8,97	0,78	ns
Total	8,55	7,14	0,29	ns

La masse de la variété Mollar de Elche varie en moyenne de  $245,0 \pm 34,1$  à  $254,2 \pm 38,0$  sans et avec traitement, respectivement, et celle de la variété Provence de  $256,1 \pm 38,7$  à  $209,4 \pm 40,4$  g (figure 3.2-A). Ces résultats indiquent que le traitement contre l'éclatement n'affecte pas significativement la masse de la variété Mollar alors que la masse de la variété Provence diminue significativement de 47 g.

Les coordonnées  $L^*$ ,  $a^*$ , et  $b^*$  des grenades Mollar de Elche sont respectivement  $65,5 \pm 6,8$ ,  $18,7 \pm 18,7$  et  $36,7 \pm 5,9$  pour le lot non traité, et  $69,7 \pm 6,2$ ,  $4,3 \pm 13,1$ ,  $40,1 \pm 4,8$  pour le lot traité (figure 3.2-B). Pour la variété Provence, les lots non traités et traités ont des coordonnées de 62,5 et 64,9 pour  $L^*$ , 32,6 et 34,9 pour  $a^*$  et 30,9 et 32,8 pour  $b^*$ . Ces résultats montrent que le traitement contre l'éclatement a un effet significatif ( $p < 0,05$ ) sur la couleur des grenades Mollar de Elche, avec une différence moyenne de 15 (sans unité), mais n'influence pas la couleur des grenades Provence ( $p > 0,05$ ). **Les grenades Mollar de Elche non traitées sont plus rouge et moins jaune que les grenades traitées.**

Les caractéristiques étudiées des variétés Mollar de Elche et Provence semblent donc évoluer différemment avec l'apport de sulfate de zinc et de bore. Deux hypothèses sur les variations observées après traitement peuvent être émises. La première serait que le traitement ne soit pas à l'origine des différences mais d'autres facteurs environnementaux non contrôlés, et la seconde que les deux variétés aient des sensibilités différentes au traitement.

Maity et al. [188] ont montré que la masse de deux variétés de grenades (Bhagawa et Mridula) reste inchangée après l'application d'un traitement composé de bore ou de sulfate de zinc ou du mélange des deux, alors que celle de la variété Ganesh augmente lors de l'application des deux composés. Dans leur étude sur la variété Ardestani, Davarpanah et al. [40] n'ont pas détecté de changement significatif de la masse des fruits avec l'apport des composés seuls ou mélangés. L'absence de variation de la masse de la variété Mollar de Elche semble en accord avec ces études, alors que la diminution de la masse de Provence paraît étonnante si seul l'effet du traitement est pris en compte. En effet, la masse des grenades a été corrélée au niveau d'irrigation des vergers [3], ce qui est cohérent avec le fait que l'eau représente plus de 70 % de la masse des grenades fraîches [300]. Dans notre étude l'irrigation des vergers n'a pas été mesurée, il paraît donc difficile de juger de l'effet du traitement foliaire sur la masse des grenades.

En revanche, d'après la littérature, l'irrigation des grenades n'influencerait ni la chroma  $C^*$ , ni l'angle de teinte  $h_{ab}$  (système CIEL\*a\*b\*) [301]. Par conséquent les changements de couleur des grenades pourraient en partie être liés à l'application du traitement foliaire. Les variations de couleurs observées entre les lots traités et non traités de la variété Mollar de Elche pourraient donc être attribuée au traitement foliaire. De plus, la couleur des grenades a été liée à la composition en polyphénols du péricarpe [108,196] qui est susceptible de varier avec l'application de bore ou de zinc comme dans d'autres fruits [302,303]. Cette hypothèse sera affirmée ou infirmée grâce à la caractérisation chimique des péricarpes de grenade.

Le traitement foliaire contre l'éclatement des grenades, composé de bore et de zinc, semblerait modifier la couleur des grenades Mollar de Elche. En revanche, il aurait aussi un effet délétère sur la masse des grenades qui reste à déterminer dans une étude complémentaire incluant l'irrigation des vergers.

### 3.1.3. Effets des conditions de culture sur les volumes de co-produits

Nous avons souhaité évaluer l'influence des conditions de culture sur la proportion de co-produits générés (g de co-produit pour 100 g de grenade, masse humide). Les résultats sont présentés sur la figure 3.3.

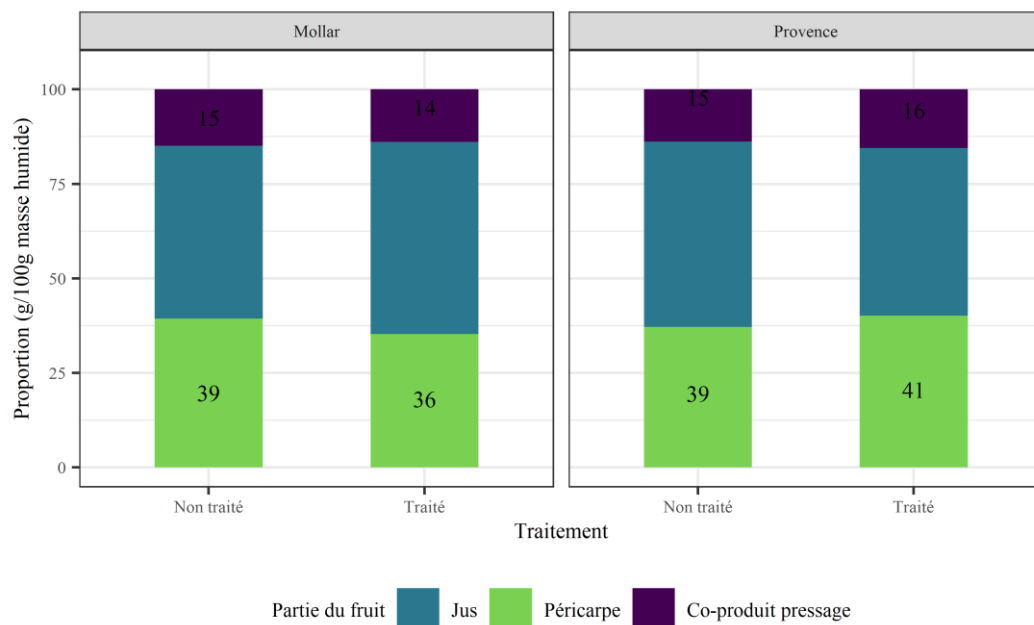


Figure 3.3 : Évolution de la proportion des co-produits (péricarpes ou co-produits de pressage des graines) et du jus en fonction de la variété et du traitement. Les proportions ont été moyennées par lots de grenades Mollar de Elche (n=5) et Provence (n=4) non traitées et traitées.

La transformation des grenades Mollar de Elche produit en moyenne 39 % de péricarpes, 46 % de jus et 15 % de co-produits de pressage et celle de Provence 39 % de péricarpe, 52 % de jus et 15 % de co-produits de pressage, pour les lots non traités. Les différences de proportion entre ces deux variétés ne sont pas significatives ( $p > 0,05$ ).

Les lots de grenades traitées contiennent 36 % et 41 % de péricarpes, et 14 % et 16 % de co-produits de pressage, pour Mollar de Elche et Provence respectivement. Les variations des proportions des péricarpes, de l'ordre de 2-3 %, et des co-produits de pressage, de l'ordre de 1 %, ne sont pas significatives ( $p > 0,05$ ). La transformation des grenades Mollar de Elche et Provence, traitées ou non contre l'éclatement, génère donc en moyenne 39 % de péricarpes et 15 % de co-produits de pressage des graines.

D'après la littérature, la proportion de péricarpes de Mollar de Elche peut être estimée en moyenne à 44 % et située entre 28 % et 63 % d'après les masses des fruits et péricarpes données dans l'étude de Martinez et al. [294]. Celles des variétés Provence et Mollar de Elche, estimées d'après l'étude de Balli et al., sont de 49 % et 36 % en moyenne [286], nos résultats sont en accord avec ces études. Onias et al. [299] ont montré que trois cultivars du Brésil pourraient contenir entre 49 % et 51 % de péricarpes et 21 % et 24 % de co-produits de pressage des graines, ce qui est légèrement supérieur à nos résultats pour les seconds. Ces variations peuvent être expliquées par les variétés étudiées, [294], les conditions pédoclimatiques [207], mais aussi la méthode de pressage des graines.

## 3.2. Caractérisation chimique des co-produits de transformation des grenades

### 3.2.1. Péricarpes

La composition en polyphénols et le rendement en extractibles au méthanol des péricarpes de grenades sont donnés dans les figures 3.4, 3.5 et 3.6 et dans le tableau 3.3.

Les rendements d'extraction (figure 3.4) des péricarpes des variétés Provence et Mollar de Elche sont compris entre 54 et 65, et 44 et 56 g/100g ms, respectivement. Les péricarpes de la variété Provence semblent donc contenir plus d'extractibles que la variété Mollar de Elche. Dans la littérature sont retrouvés des rendements d'extraction dans du méthanol ou un mélange méthanol et eau à différents ratios compris entre 11 et 47 g/100g ms qui varient fortement selon la méthode et les paramètres employés [127,167,263,264,304,305].

Les teneurs en polyphénols totaux (figure 3.5) sont situées entre 148-311 et 192-379 mg eag/g ms pour Mollar de Elche et Provence, respectivement, et semblent très hétérogènes selon les lots de péricarpes. Calin-Sanchez et al. ont évalué à 118 mg eag/g ms la teneur en polyphénols totaux de la variété Mollar de Elche [228]. Les plus hautes valeurs obtenues dans cette étude peuvent résulter des conditions d'extraction mais également des conditions pédoclimatiques avant la récolte des grenades.



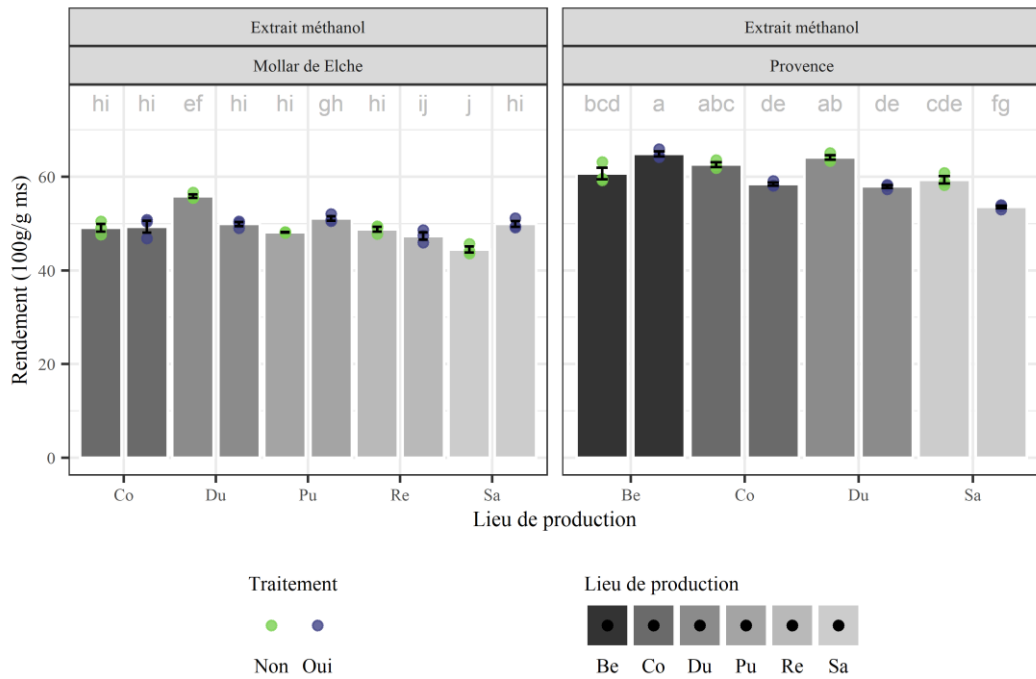


Figure 3.4 : Rendement en extractibles des péricarpes de grenade par variété, lieu de production, et traitement. Le rendement en extractibles des échantillons (n=3) est représenté en vert (lots non traités) et violet (lots traités) pour les variétés Mollar de Elche (gauche) et Provence (droite). Les moyennes (barres) sont colorées de gris foncé à gris clair pour les parcelles “Be”, “Co”, “Du”, “Pu”, “Re”, “Sa”. Des lettres identiques témoignent de l’absence de différence significative, prenant en compte l’ensemble des deux variétés (Anova et Tukey,  $p > 0,05$ ).

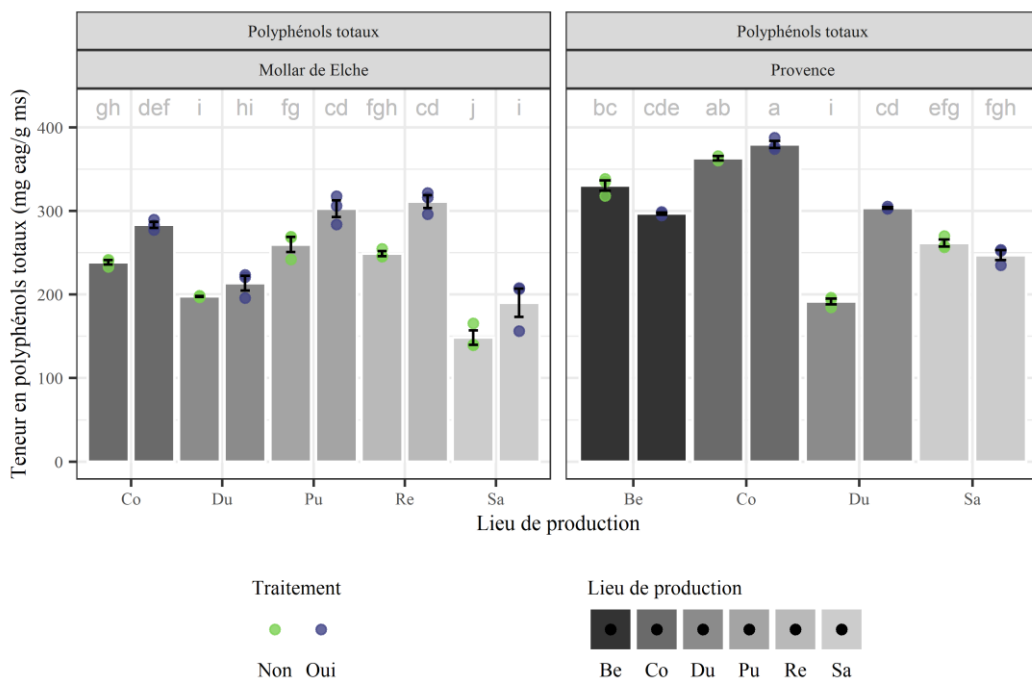


Figure 3.5 : Teneurs en polyphénols totaux des péricarpes de grenades par variété, lieu de production, et traitement. La teneur en polyphénols totaux (n=3) est représentée en vert (lots non traités) et violet (lots traités) pour les deux variétés. Les moyennes (barres) sont colorées de gris foncé à gris clair pour chaque parcelle, “Be”, “Co”, “Du”, “Pu”, “Re”, “Sa”. Des lettres identiques témoignent de l’absence de différence significative, prenant en compte l’ensemble des deux variétés (Anova et Tukey,  $p > 0,05$ ).

Les teneurs en punicalagine, punicaline et acide ellagique (figure 3.6) sont situées entre 73,3 et 206,9 mg/g ms, entre 0,9 et 3,3 mg/g ms, et entre 2,2 et 5,0 mg/g ms, respectivement.

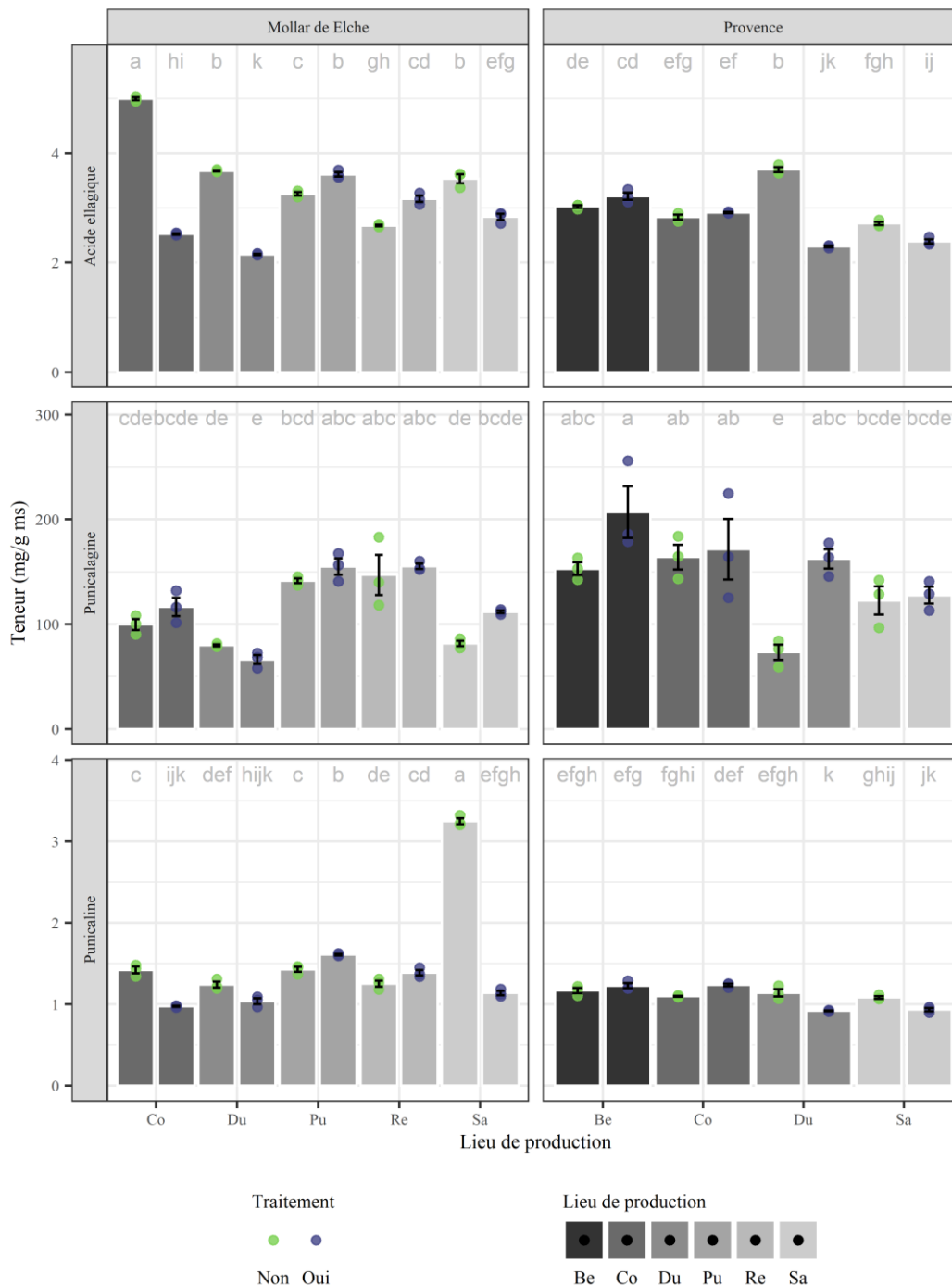


Figure 3.6 : Teneurs en punicalagine, punicaline et acide ellagique des péricarpes de grenades par variété, lieu de production, et traitement. Les teneurs en ellagitannins des échantillons ( $n=3$ ) sont représentées en vert (lots non traités) et violet (lots traités) pour chaque variété. Les moyennes (barres) sont colorées de gris foncé à gris clair pour chaque parcelle. Des lettres identiques témoignent de l'absence de différence significative, prenant en compte les deux variétés (Anova et Tukey,  $p > 0,05$ ).

Parmi les polyphénols individuels sélectionnés, la punicalagine apparaît largement majoritaire pour les deux variétés devant la punicaline et l'acide ellagique. Cet ellagitannin a été aussi décrit comme largement majoritaire devant l'acide ellagique dans les péricarpes de la variété Mollar de Elche, avec une teneur de 211,7 mg/g ms pour la punicalagine et 1,7 mg/g ms pour l'acide ellagique [228].

Les teneurs en polyphénols sélectionnés (punicalagine, punicaline et acide ellagique) varient de manière significative ( $p < 0,05$ ) entre les lots de péricarpes comme les teneurs en polyphénols totaux ( $p < 0,05$ ) et le rendement en extractibles ( $p < 0,05$ ). Des divergences des teneurs en extractibles des péricarpes ont été montrées entre les variétés de grenades dans de nombreuses études [55,112,142,167,194,196,197,286,306,307], alors que l'influence de la localisation et du traitement foliaire des fruits sur la composition en polyphénols des péricarpes a très peu été étudiée [204,207,308].

Tableau 3.3 : Caractérisation chimique des péricarpes des grenades. Les valeurs sont données pour chaque lot de co-produits des variétés Mollar de Elche (M) et Provence (P) issues des parcelles "Be", "Co", "Du", "Pu", "Re", "Sa" (Localisation) ayant été traitées contre l'éclatement (Traitement : "Oui") ou non traitées (Traitement : "Non").

Code Lot	Variété	Localisation	Traitement	Composition du péricarpe (pour 1 ou 100 g ms)				Composition de l'extrait (pour 100 g ms)				
				Rendement extractibles (g/100g ms)	Polyphénols totaux (mg eag/g ms)	Punicalagine (mg/g ms)	Punicaline (mg/g ms)	Acide ellagique (mg/g ms)	Polyphénols totaux (g eag/100g ms)	Punicalagine (g/100g ms)	Punicaline (g/100g ms)	Acide ellagique (g/100g ms)
<b>Mollar de Elche</b>												
2019CoMNT	M	Co	Non	49 ± 1	238,4 ± 4,7	99,7 ± 9,0	1,4 ± 0,1	5,0 ± 0,0	48,6 ± 1,6	20,3 ± 1,6	0,3 ± 0,0	1,0 ± 0,0
2019CoMT	M	Co	Oui	49 ± 2	283,3 ± 6,2	116,5 ± 15,2	1,0 ± 0,0	2,5 ± 0,0	57,5 ± 1,6	23,6 ± 2,2	0,2 ± 0,0	0,5 ± 0,0
2019DuMNT	M	Du	Non	56 ± 1	197,8 ± 1,0	79,8 ± 1,6	1,2 ± 0,1	3,7 ± 0,0	35,4 ± 0,6	14,3 ± 0,4	0,2 ± 0,0	0,7 ± 0,0
2019DuMT	M	Du	Oui	50 ± 1	213,4 ± 15,2	66,4 ± 7,5	1,0 ± 0,1	2,1 ± 0,0	42,8 ± 3,5	13,3 ± 1,7	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0
2019PuMNT	M	Pu	Non	48 ± 0	259,8 ± 15,6	141,5 ± 4,1	1,4 ± 0,1	3,3 ± 0,1	54,0 ± 3,4	29,4 ± 0,8	0,3 ± 0,0	0,7 ± 0,0
2019PuMT	M	Pu	Oui	51 ± 1	302,7 ± 17,3	155,0 ± 13,4	1,6 ± 0,0	3,6 ± 0,1	59,2 ± 3,5	30,3 ± 2,7	0,3 ± 0,0	0,7 ± 0,0
2019ReMNT	M	Re	Non	49 ± 1	248,8 ± 5,2	147,0 ± 33,1	1,3 ± 0,1	2,7 ± 0,0	51,0 ± 1,1	30,2 ± 7,3	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,0
2019ReMT	M	Re	Oui	47 ± 1	311,2 ± 13,2	155,2 ± 4,4	1,4 ± 0,1	3,2 ± 0,1	65,7 ± 1,1	32,8 ± 1,3	0,3 ± 0,0	0,7 ± 0,0
2019SaMNT	M	Sa	Non	44 ± 1	148,4 ± 14,8	81,7 ± 4,5	3,2 ± 0,1	3,5 ± 0,1	33,4 ± 3,9	18,4 ± 1,4	0,7 ± 0,0	0,8 ± 0,1
2019SaMT	M	Sa	Oui	50 ± 1	190,2 ± 29,4	111,7 ± 2,2	1,1 ± 0,0	2,8 ± 0,1	38,2 ± 6,6	22,4 ± 0,9	0,2 ± 0,0	0,6 ± 0,0
<b>Provence</b>												
2019BePNT	P	Be	Non	61 ± 2	330,4 ± 10,8	152,9 ± 10,4	1,2 ± 0,1	3,0 ± 0,0	54,5 ± 1,7	25,3 ± 2,5	0,2 ± 0,0	0,5 ± 0,0
2019BePT	P	Be	Oui	65 ± 1	296,8 ± 2,3	206,9 ± 42,7	1,2 ± 0,1	3,2 ± 0,1	45,8 ± 0,4	31,9 ± 6,7	0,2 ± 0,0	0,5 ± 0,0
2019CoPNT	P	Co	Non	63 ± 1	363,1 ± 3,8	164,0 ± 20,3	1,1 ± 0,0	2,8 ± 0,1	57,9 ± 1,8	26,2 ± 3,0	0,2 ± 0,0	0,5 ± 0,0
2019CoPT	P	Co	Oui	58 ± 1	379,5 ± 7,3	171,5 ± 50,2	1,2 ± 0,0	2,9 ± 0,0	65,0 ± 1,7	29,4 ± 8,7	0,2 ± 0,0	0,5 ± 0,0
2019DuPNT	P	Du	Non	64 ± 1	191,6 ± 6,0	73,3 ± 12,7	1,1 ± 0,1	3,7 ± 0,1	29,9 ± 0,8	11,4 ± 1,8	0,2 ± 0,0	0,6 ± 0,0
2019DuPT	P	Du	Oui	58 ± 0	303,6 ± 1,7	162,3 ± 16,0	0,9 ± 0,0	2,3 ± 0,0	52,4 ± 0,3	28,0 ± 3,0	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0
2019SaPNT	P	Sa	Non	59 ± 1	261,5 ± 7,4	122,5 ± 23,4	1,1 ± 0,0	2,7 ± 0,1	44,1 ± 1,8	20,6 ± 3,5	0,2 ± 0,0	0,5 ± 0,0
2019SaPT	P	Sa	Oui	54 ± 0	247,1 ± 10,3	127,7 ± 13,9	0,9 ± 0,0	2,4 ± 0,1	46,2 ± 2,1	23,9 ± 2,8	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0
			p	1,0e-24	8,8e-23	2,5e-09	3,5e-34	4,2e-33				
			p cor.(H)	1,5e-23	1,2e-21	1,5e-08	6,4e-33	7,2e-32				

Les valeurs sont les moyennes ± écart-type de l'analyse de trois échantillons. La significativité de l'origine de la matière est donnée par la p-valeur d'une analyse de la variance (p), puis ajustée avec la correction de Holm (p cor. (H)).

### 3.2.2. Co-produits de pressage de graines

Comme pour les péricarpes, les co-produits de pressage des graines ont été obtenus par pressage des graines de grenades issues des 18 lots de grenades des variétés Mollar de Elche et Provence, cultivées sur six parcelles de la région Occitanie, avec ou sans traitement contre l'éclatement. La teneur en huile et le profil d'acides gras des co-produits de pressage ont ensuite été analysés par une méthode gravimétrique et par chromatographie en phase gazeuse comme décrit dans le chapitre 2. Les figures 3.7 et 3.8 ainsi que le tableau 3.4 présentent le rendement en huile et les teneurs relatives des acides gras identifiés pour chaque lot de co-produit de pressage de graines de grenades.

La teneur en huile (figure 3.7) est comprise entre 14 et 27 % pour Mollar de Elche et entre 13 et 22 % pour Provence, et varie significativement ( $p < 0,05$ ) entre les différents lots de co-produits. Durdevic et al. ont décrit des rendements en huile de 22 et 28 % dans les co-produits d'une variété bosnienne extraits par extraction au  $\text{CO}_2$  supercritique et macération au soxhlet (*n*-hexane) respectivement [88]. Dans leur étude, les co-produits de pressage des graines ont été nettoyés pour ne garder que la partie interne de la graine de grenade ce qui pourrait expliquer ces rendements plus élevés, en plus de la différence de variété étudiée.

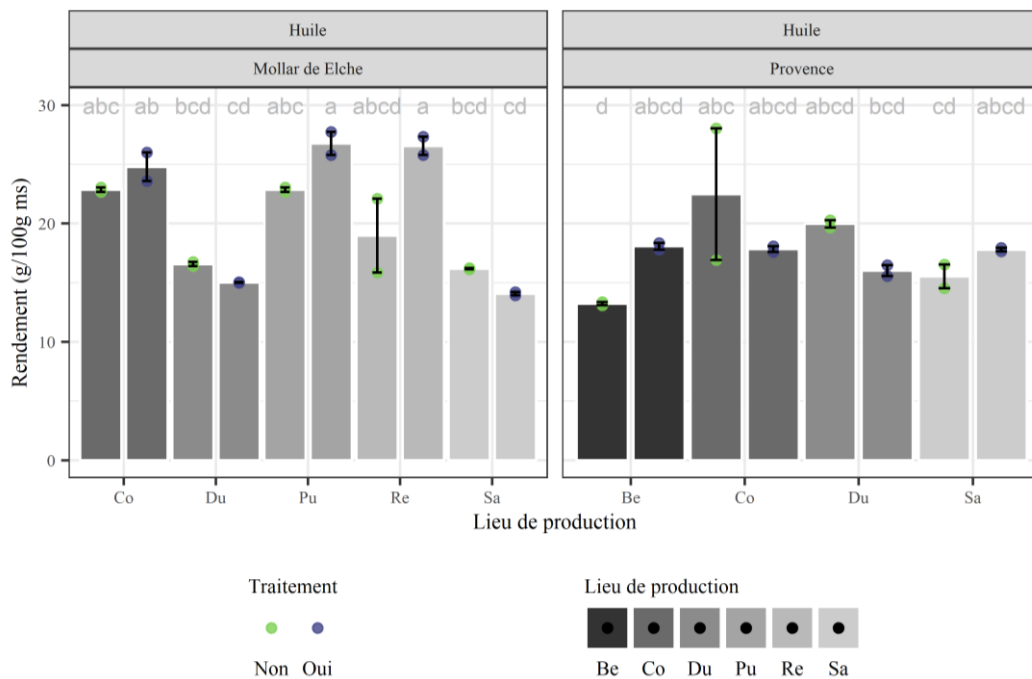


Figure 3.7 : Rendement en huile des co-produits de pressage des graines de grenades par variété, lieu de production, et traitement. Le rendement en huile ( $n=2$ ) est représenté en vert (lots non traités) et violet (lots traités) pour Mollar de Elche (gauche) et Provence (droite). Les moyennes (barres) sont colorées de gris foncé à gris clair pour, dans l'ordre, les parcelles "Be", "Co", "Du", "Pu", "Re", "Sa". Des lettres identiques témoignent de l'absence de différence significative, prenant en compte l'ensemble des deux variétés (Anova et Tukey,  $p > 0,05$ ).

Pour les deux variétés, l'acide punicoïque (figure 3.8) est présent à des teneurs relatives comprises entre 80,7-83,6 % pour Mollar de Elche et 79,7-83,7 % pour Provence, et est l'acide gras majoritaire. Les acides palmitique, stéarique, oléique et linoléique ont des teneurs relatives supérieures à 1 % : respectivement de 2,8-3,5, 1,7-2,0, 4,2-5,0 et 4,6-6,6 % pour Mollar de Elche et 2,7-3,2, 1,7-2,6, 4,4-6,5 et 4,5-6,1 % pour Provence. Les isomères de l'acide punicoïque (acides catalpique et  $\beta$ -éléostéarique) et les autres acides gras ont tous des teneurs relatives inférieures à 1 %.

Toutes les teneurs en acides gras varient significativement entre les lots de co-produits ( $p < 0,05$ ), à l'exception de l'acide palmitoléique dont la présence n'a pas été détectée. Alcaraz-Marmol et al. ont aussi décrit l'acide punicoïque comme prédominant parmi les acides gras de co-produits de pressage des graines avec des teneurs comprises entre 59,7 et 72,7 % des acides gras totaux, mais ont quantifiés une plus grande proportion d'isomères de l'acide punicoïque 8,2-14,9, 1,4-3,7, 5,0-9,2, et des teneurs comparables en acide palmitique (3,5-5,1), stéarique (0,4-0,7), acide oléique (4,1-5,2), linoléique (3,6-5,7), et arachidique (0,6-0,9) [193]. La même tendance a été observée par Oliveira et al. dans les graines de grenades de la variété Mollar de Elche [209].

Les rendements en huile et les teneurs relatives des acides gras identifiés varient entre les lots de co-produits de pressage des graines. Toutes variétés et origines géographiques confondues, pour les lots traités et témoins, la variation moyenne de la teneur en huile est de 5 %, pour des teneurs de 13 % à 27 %. Celle de l'acide punicoïque est de 1,3 %, pour des teneurs de 79,7 % à 83,7 %, et constitue la variation maximale observée parmi tous les acides gras identifiés.

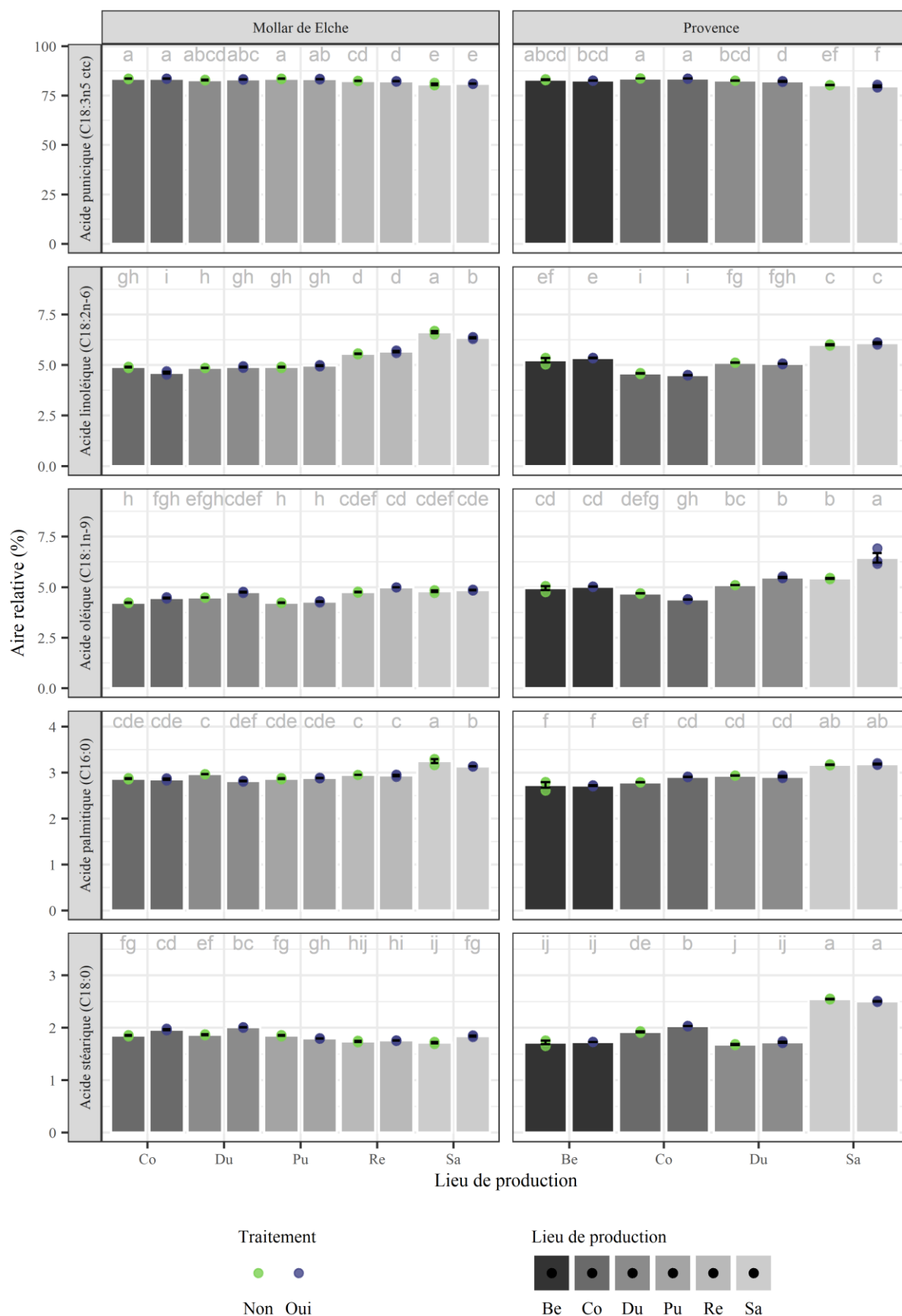


Figure 3.8 : Teneur relative des principaux acides gras identifiés des co-produits de pressage des graines de grenades par variété, lieu de production, et traitement. Les teneurs en acides gras principaux, dont la teneur relative est supérieure à 1 %, des échantillons de co-produits de pressage des graines (n=3) sont représentés par des points vert (lots non traités) et violet (lots traités) des variétés Mollar de Elche (gauche) et Provence (droite). Les moyennes (barres) sont représentées de gris foncé à gris clair pour, dans l'ordre, les parcelles "Be", "Co", "Du", "Pu", "Re", "Sa". Des lettres identiques témoignent de l'absence de différence significative, prenant en compte l'ensemble des deux variétés (Anova et Tukey,  $p > 0,05$ ).

Tableau 3.4 : Caractérisation chimique des co-produits de pressage des grenades. Les valeurs sont données pour chaque lot de co-produits des variétés Mollar de Elche (M) et Provence (P) issues des parcelles "Be", "Co", "Du", "Pu", "Re", "Sa" (Localisation, L) ayant été traitées contre l'éclatement (Traitement, T : "Oui") ou non traitées (Traitement, T : "Non").

L	T	Rendement huile (g/100g ms)	Acide myristique C14:0 (%)	Acide palmitique C16:0 (%)	Acide palmitoléique C16:1n-7 (%)	Acide stéarique C18:0 (%)	Acide oléique C18:1n-9 c (%)	Acide linoléique C18:2n-6 c (%)	Acide linoléinique C18:3n-3 c (%)	Acide punicique C18:3n-5 c,t,c (%)	Acide catalpique C18:3n-5 t,t,c (%)	Acide β-éléostéarique C18:3n-5 t,t,t (%)	Acide arachidique C20:0 (%)	Acide eicosénoïque C20:1n-9 c (%)	Acide béhénique C22:0 (%)	Acide lignocérique C24:0 (%)
<b>Mollar de Elche</b>																
Co	Non	23 ± 0	0,04 ± 0,01	2,87 ± 0,01	n.d.	1,85 ± 0,01	4,23 ± 0,02	4,90 ± 0,04	n.d.	83,54 ± 0,11	0,93 ± 0,02	0,72 ± 0,02	0,44 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,05 ± 0,08	n.d.
Co	Oui	25 ± 2	0,03 ± 0,00	2,86 ± 0,02	n.d.	1,96 ± 0,02	4,47 ± 0,04	4,62 ± 0,09	n.d.	83,57 ± 0,10	0,90 ± 0,02	0,60 ± 0,04	0,44 ± 0,00	0,40 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,02 ± 0,04
Du	Non	17 ± 0	0,03 ± 0,00	2,97 ± 0,00	n.d.	1,87 ± 0,02	4,49 ± 0,01	4,86 ± 0,01	0,04 ± 0,00	82,84 ± 0,30	0,88 ± 0,09	0,93 ± 0,17	0,41 ± 0,01	0,35 ± 0,00	0,27 ± 0,01	0,06 ± 0,02
Du	Oui	15 ± 0	0,03 ± 0,01	2,82 ± 0,01	n.d.	2,01 ± 0,01	4,75 ± 0,03	4,90 ± 0,04	n.d.	83,20 ± 0,12	0,69 ± 0,07	0,69 ± 0,03	0,44 ± 0,01	0,38 ± 0,02	0,08 ± 0,03	n.d.
Pu	Non	23 ± 0	0,04 ± 0,01	2,87 ± 0,01	n.d.	1,85 ± 0,01	4,23 ± 0,02	4,90 ± 0,04	n.d.	83,54 ± 0,11	0,93 ± 0,02	0,72 ± 0,02	0,44 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,05 ± 0,08	n.d.
Pu	Oui	27 ± 1	0,02 ± 0,01	2,88 ± 0,01	n.d.	1,80 ± 0,01	4,29 ± 0,03	4,97 ± 0,03	n.d.	83,34 ± 0,10	0,96 ± 0,01	0,73 ± 0,02	0,45 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,15 ± 0,01	n.d.
Re	Non	19 ± 4	0,04 ± 0,01	2,95 ± 0,00	n.d.	1,74 ± 0,02	4,75 ± 0,03	5,56 ± 0,03	n.d.	82,44 ± 0,09	0,87 ± 0,04	0,68 ± 0,05	0,45 ± 0,00	0,40 ± 0,01	0,11 ± 0,02	n.d.
Re	Oui	27 ± 1	0,02 ± 0,01	2,94 ± 0,03	n.d.	1,76 ± 0,01	4,99 ± 0,00	5,66 ± 0,06	n.d.	82,26 ± 0,14	0,79 ± 0,05	0,60 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,13 ± 0,00	n.d.
Sa	Non	16 ± 0	0,02 ± 0,01	3,25 ± 0,07	n.d.	1,72 ± 0,02	4,80 ± 0,07	6,63 ± 0,09	n.d.	80,73 ± 0,73	1,04 ± 0,21	0,76 ± 0,22	0,46 ± 0,01	0,37 ± 0,02	0,17 ± 0,00	0,05 ± 0,01
Sa	Oui	14 ± 0	0,02 ± 0,00	3,14 ± 0,01	n.d.	1,84 ± 0,02	4,86 ± 0,02	6,34 ± 0,05	n.d.	81,00 ± 0,14	1,00 ± 0,02	0,82 ± 0,07	0,47 ± 0,02	0,37 ± 0,01	0,15 ± 0,03	n.d.
<b>Provence</b>																
Be	Non	13 ± 0	0,01 ± 0,01	2,73 ± 0,11	n.d.	1,72 ± 0,06	4,95 ± 0,17	5,24 ± 0,19	0,01 ± 0,01	83,05 ± 0,34	0,77 ± 0,13	0,51 ± 0,10	0,42 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,04 ± 0,03
Be	Oui	18 ± 0	0,03 ± 0,00	2,72 ± 0,01	n.d.	1,73 ± 0,00	5,02 ± 0,01	5,35 ± 0,02	n.d.	82,63 ± 0,08	0,89 ± 0,05	0,64 ± 0,03	0,42 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Co	Non	22 ± 8	0,02 ± 0,00	2,79 ± 0,00	n.d.	1,92 ± 0,02	4,70 ± 0,01	4,58 ± 0,02	n.d.	83,67 ± 0,08	0,80 ± 0,08	0,54 ± 0,00	0,42 ± 0,00	0,37 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,07 ± 0,02
Co	Oui	18 ± 0	0,03 ± 0,00	2,91 ± 0,01	n.d.	2,03 ± 0,00	4,40 ± 0,01	4,50 ± 0,02	n.d.	83,63 ± 0,06	0,92 ± 0,01	0,61 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Du	Non	20 ± 0	0,02 ± 0,00	2,94 ± 0,00	n.d.	1,68 ± 0,01	5,11 ± 0,00	5,12 ± 0,01	0,03 ± 0,00	82,61 ± 0,11	0,69 ± 0,04	0,68 ± 0,07	0,40 ± 0,00	0,40 ± 0,00	0,27 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Du	Oui	16 ± 1	0,02 ± 0,00	2,91 ± 0,03	n.d.	1,72 ± 0,02	5,48 ± 0,05	5,06 ± 0,02	n.d.	82,17 ± 0,26	0,97 ± 0,05	0,64 ± 0,12	0,42 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,04 ± 0,00
Sa	Non	16 ± 1	0,04 ± 0,00	3,17 ± 0,01	n.d.	2,55 ± 0,01	5,43 ± 0,04	6,00 ± 0,04	n.d.	80,31 ± 0,10	0,91 ± 0,03	0,62 ± 0,03	0,49 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Sa	Oui	18 ± 0	0,02 ± 0,00	3,19 ± 0,02	n.d.	2,51 ± 0,01	6,45 ± 0,41	6,08 ± 0,06	n.d.	79,71 ± 0,72	0,55 ± 0,48	0,55 ± 0,04	0,46 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,13 ± 0,00	0,04 ± 0,00
	p	6,6e-05	1,3e-09	1,9e-20		1,1e-35	1,3e-21	2,1e-31	2,6e-16	1,2e-19	0,016	7,1e-05	8,0e-14	1,3e-17	1,5e-07	1,8e-07
	P <sub>cor.(H)</sub>	0,0002	9,0e-09	2,3e-19		2,0e-34	1,8e-20	3,4e-30	2,4e-15	1,4e-18	0,016	0,0002	6,4e-13	1,3e-16	7,6e-07	7,6e-07

Les valeurs sont les moyennes ± écart-type de l'analyse de trois échantillons, et deux échantillons pour le rendement en huile. La significativité de l'origine des co-produits est donnée par la p-valeur d'une analyse de la variance (p), puis ajustée avec la correction de Holm (p cor. (H)). n.d. : non détecté, L : Localisation, T : Traitement.



### **3.3. Influence des conditions de culture sur les teneurs en composés à valeur ajoutée des co-produits de transformation des grenades**

Une analyse en composantes principales a été menée avec les résultats décrits précédemment. Elle a pour but d'expliquer les variations entre des individus (les échantillons analysés) à l'aide de variables numériques (la composition chimique des co-produits).

Les individus ont été représentés de manière à maximiser la variation inter-individus, et selon des composantes qui sont la somme linéaire des variables numériques de départ. Les résultats doivent permettre de dégager les composés des co-produits de grenades expliquant le plus les différences entre les échantillons, c'est-à-dire les teneurs avec la plus grande variabilité entre les variétés, localisations et traitements. Dans un second temps, les effets de la variété, de la localisation et du traitement des grenadiers ont été approfondis pour les composés sélectionnés.

#### **3.3.1. Influence des conditions de culture sur les polyphénols des péricarpes**

##### **3.3.1.a. Etude préliminaire de la composition chimique : sélection des polyphénols par analyse multivariée**

Les résultats de l'analyse en composantes principale pour les polyphénols des péricarpes de grenades sont donnés dans le tableau 3.5 et les figures 3.9, 3.10, 3.11, et 3.12. La première composante PC1 représente 48,4 % de la variance, la seconde composante PC2 21,0 % et la troisième composante PC3 17,3 %, pour un total de 86,7 % de variance expliquée entre les échantillons. Près de 90 % de la dispersion entre les échantillons est représentée sur ces trois composantes qui expliquent donc bien le jeu de données.

Tableau 3.5 : Variables et facteurs interprétables de l'analyse en composante principale, par composantes sélectionnées PC1, PC2 et PC3. Les variables et facteurs interprétables sur chaque composante sont mis en évidence en gras.

Variable	Code variable	PC1 (48,4 %)	p (PC1)	PC2 (21,0 %)	p (PC2)	PC3 (17,3 %)	p (PC3)
<b>Variable</b>							
Rendement extrait (g/g ms)	rdt_meoh	<b>0,65</b>	<b>0,000</b>	0,01	0,943	<b>0,66</b>	<b>0,000</b>
Polyphénols totaux (mg eag/g ms)	TPC	<b>0,85</b>	<b>0,000</b>	0,34	0,012	-0,18	0,192
Punicalagine (mg/g ms)	punicalagine	<b>0,76</b>	<b>0,000</b>	0,48	0,000	-0,30	0,027
Punicaline (mg/g ms)	punicaline	<b>-0,69</b>	<b>0,000</b>	0,50	0,000	-0,27	0,052
Acide ellagique (mg/g ms)	a,ellagique	-0,46	0,000	<b>0,67</b>	<b>0,000</b>	0,49	0,000
<b>Facteur étudié</b>							
Lot de co-produit			<b>0,000</b>		<b>0,000</b>		<b>0,000</b>
Variété			<b>0,000</b>		0,895		<b>0,005</b>
Localisation			<b>0,009</b>		<b>0,000</b>		<b>0,000</b>
Traitement			<b>0,014</b>		0,135		<b>0,003</b>
Réplicat échantillon			0,988		0,941		0,863

La significativité des variables avec chaque composante est obtenue à partir de celle de la corrélation de Pearson entre les deux (test t de Student), et celle des facteurs étudiés par ANOVA.

Les teneurs en polyphénols totaux et punicalagine sont corrélées positivement entre-elles, et négativement avec les teneurs en punicaline et acide ellagique (figure 3.9). Les échantillons présentant des teneurs en polyphénols totaux et punicalagine élevées présentent par conséquent aussi des teneurs faibles en punicaline et acide ellagique. Cela suggère qu'une haute teneur en polyphénols totaux est synonyme d'une haute teneur en punicalagine, et par conséquent que la teneur en punicalagine représente bien la teneur en polyphénols des péricarpes de grenades. Le rendement en extractibles au méthanol n'est par ailleurs pas directement corrélé avec les teneurs en polyphénols qui représentent en moyenne 49 % des extractibles pour les deux variétés (tableau 3.3). Cela semble indiquer que les variations du rendement d'extraction des péricarpes de grenades sont également imputables à des composés autres que les polyphénols.

Les extractibles pouvant être obtenus dans nos conditions sont les composés présents dans les péricarpes des grenades solubles dans le méthanol à 20 °C, c'est-à-dire à la fois des métabolites primaires comme les glucides ou les acides organiques et des métabolites secondaires comme les polyphénols ou des hétérosides [164]. Les criblages des familles moléculaires présentes dans des extraits méthanoliques de péricarpe de grenade ont par ailleurs montré la présence d'alcaloïdes, anthraquinones, sucres, hétérosides cardiotoniques, flavonoïdes, hétérosides, sucres réducteurs, résine, amidon, stérols, tannins, terpénoïdes et volatiles, et selon la méthode employée la présence de saponines [309–312]. Parmi ceux-ci, les glucides seraient majoritaires avec une teneur totale estimée à 67 % des péricarpes [104], dont 28 à 62 % de fibres solubles et 7 à 24 % de pectines [111–113].

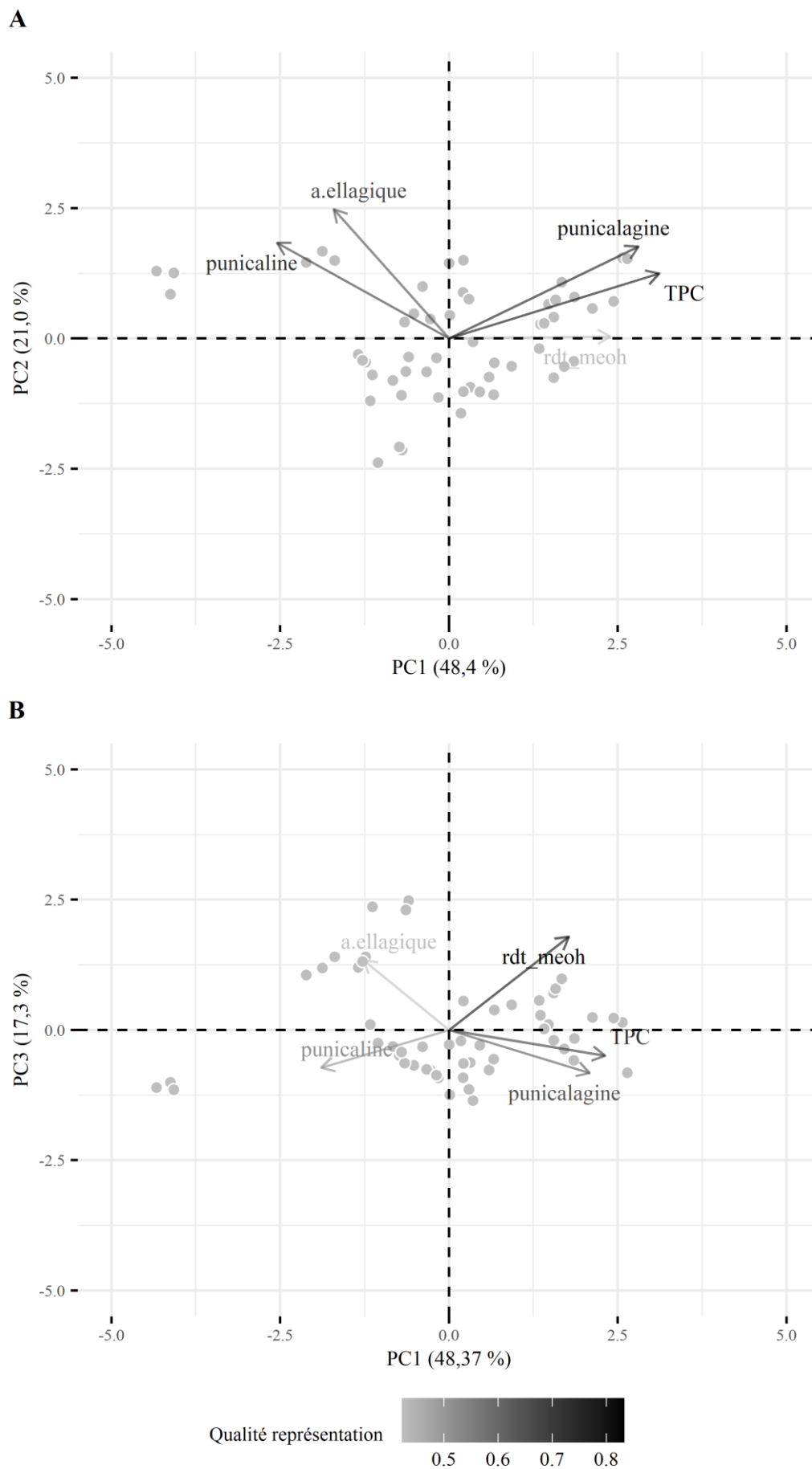


Figure 3.9 : Relations entre le rendement en extractibles et les teneurs en polyphénols totaux, punicalagine, punicaline et acide ellagique des péricarpes de grenades. Représentation sur les plans formés par les composantes PC1,PC2 et PC1,PC3 des individus (18 échantillons, 3 répétitions) et de leurs variables (composés). La qualité de la représentation des composés (vecteurs) sur les plans est donnée par un indice croissant de gris à noir.

### 3.3.1.a.i. Effet variété

La variété de grenade explique la dispersion entre les échantillons de péricarpes ( $p < 0,001$ , tableau 3.5) qui sont représentés par variété sur la figure 3.10. La variété Mollar de Elche est caractérisée par des teneurs en acide ellagique et punicaline élevées, en moyenne 3,2 (2,2-5,0) et 1,5 (1,0-3,3) mg/g ms, ainsi que des rendements en extractibles et des teneurs en polyphénols totaux et en punicalagine faibles, en moyenne 49 (44-56) %, 239 (148-311) mg eag/g ms et 115 (66-155) mg/g ms. A l'inverse, Provence présente des rendements en extractibles et des teneurs en polyphénols totaux et punicalagine plus élevés, en moyenne 60 (54-65) %, 294 (192-379) mg eag/g ms, et 148 (73-207) mg/g ms, ainsi que des teneurs en acide ellagique et punicaline faibles, en moyenne 2,9 (2,2-3,7) et 1,1 (0,9-1,2) mg/g ms. La variété Provence contient donc 1,2 à 1,3 fois plus d'extractibles, de polyphénols totaux, et de punicalagine, ainsi que 1,3 fois moins de punicaline et 1,1 fois moins d'acide ellagique que la variété Mollar de Elche. Ces variations restent néanmoins relativement faibles.

Dans la littérature, les variétés Mollar de Elche et Provence ont été comparées dans une seule étude à notre connaissance [286]. La décoction de Provence est plus riche en ellagitannins (90 mg équivalent acide ellagique eae/g d'extrait ms) que celle de Mollar de Elche (75 mg eae/g d'extrait ms), parmi lesquels l'acide ellagique, la punicalagine et leurs dérivés ont été identifiés. La plus haute teneur en punicalagine est retrouvée pour la variété Provence (74 mg/g d'extrait ms), alors que celles des dérivés de la punicalagine (18,7 mg/g) et de l'acide ellagique (4,9 mg/g) sont décrites pour Mollar de Elche. La teneur en acide ellagique des décoctions des deux variétés est similaire, avec 0,4 et 0,5 mg/g pour Mollar de Elche et Provence. Ces résultats concordent avec les nôtres sur la richesse en punicalagine des péricarpes de Provence et les similitudes en acide ellagique. En revanche, les plus faibles teneurs en acide ellagique décrites [286] peuvent résulter de sa faible solubilité dans l'eau (9,7  $\mu\text{g/mL}$  à 37 °C) par rapport au méthanol (671,7  $\mu\text{g/mL}$  à 37 °C) employé dans notre étude [313]. Les valeurs obtenues dans la décoction peuvent correspondre à un maximum de solubilité de l'acide ellagique dans l'eau lors de l'extraction (décoction, eau, 1 h, 100 °C, ratio solide-liquide 1/40 puis refroidissement à température ambiante et centrifugation). De plus, le refroidissement de la décoction pourrait engendrer une précipitation du composé, contrairement à nos conditions d'extraction (macération, méthanol, 1h, 20 °C, ratio solide-liquide 1/30, puis filtration).

L'étude de Balli et al. [286] montre également que la teneur en polyphénols totaux est plus élevée dans la décoction de Mollar de Elche que celle de Provence (258 et 226 mg eag/g, respectivement) malgré une teneur en ellagitannins plus faible. Ces différences peuvent aussi résulter des solubilités variables des polyphénols dans les solvants organiques et l'eau, dépendantes de la température [165]. Sachant que la présence de polysaccharides d'origine végétale augmente l'extractibilité de certains flavonoïdes aglycones et glycosylés [314] et que les extraits aqueux de péricarpes de grenades sont plus riches en sucres et polysaccharides que des mélanges moins polaires [315], la plus haute teneur en polysaccharides des péricarpes de Mollar de Elche (8,4 % g/g ms) par rapport à Provence (3,8 % g/g ms) a donc pu promouvoir l'extraction des flavonoïdes des co-produits et ainsi augmenter la teneur en polyphénols totaux [286]. Les paramètres de culture des deux variétés dans notre étude peuvent aussi avoir un impact sur les extractibles : leur influence est discutée ci-après.

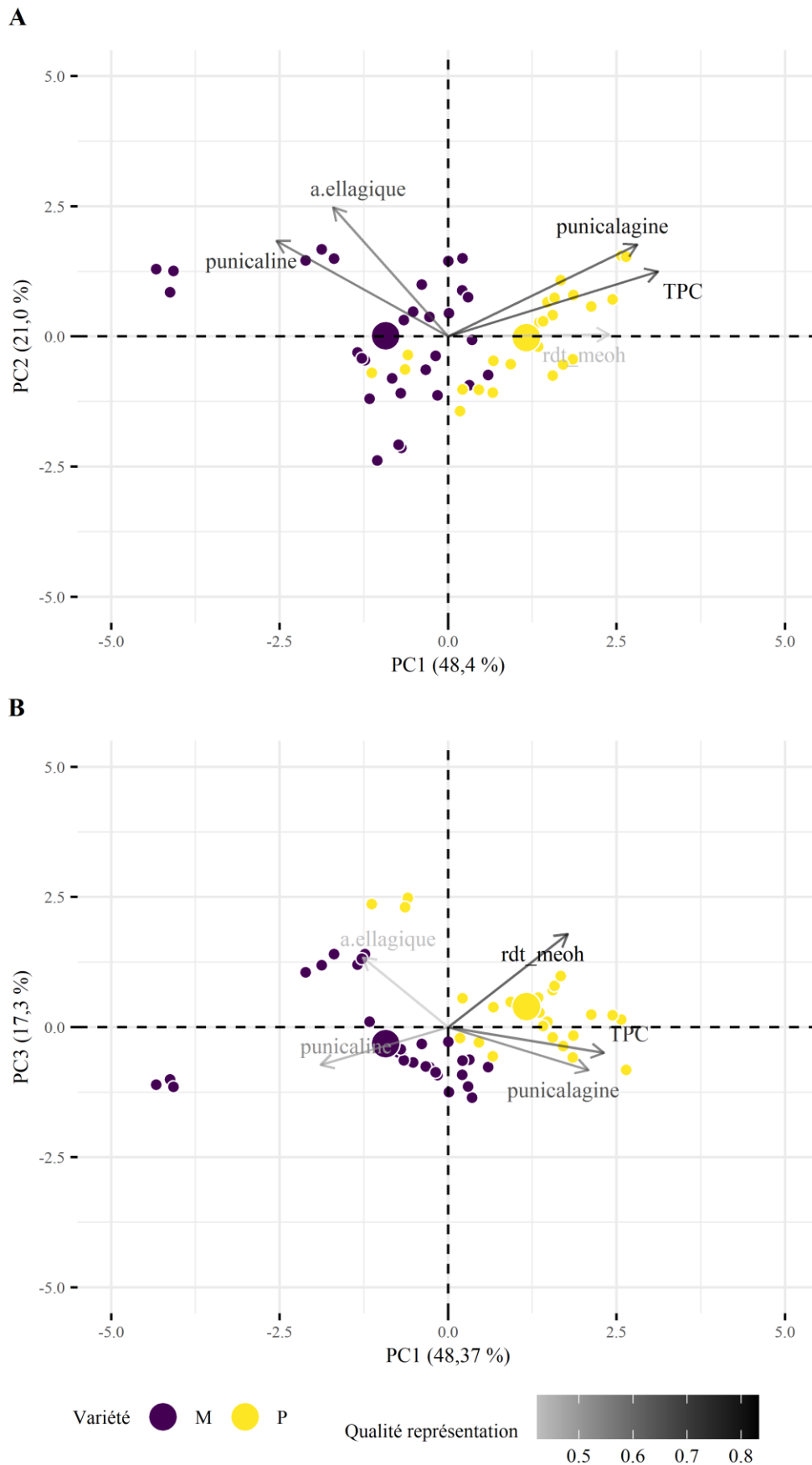


Figure 3.10 : Effet de la variété sur le rendement en extractibles et les teneurs en polyphénols totaux, punicalagine, punicaline et acide ellagique des péricarpes de grenades. Représentation sur les plans formés par les composantes PC1,PC2 et PC1,PC3 des individus et leur barycentre (points) et de leurs variables (composés). La qualité de la représentation des composés (vecteurs) sur les plans est donnée par un indice croissant de gris à noir, et la variété est représentée en violet (Mollar de Elche, n=30) et jaune (Provence, n=24).

### 3.3.1.a.ii. Effet des conditions pédoclimatiques

La figure 3.11 présente la composition des péricarpes selon l'origine géographique de prélèvement des fruits. D'après les éléments présentés précédemment, cette origine influence aussi la composition des péricarpes de grenades ( $p < 0,01$ , tableau 3.5).

Trois groupes de parcelles peuvent être formés selon les teneurs en polyphénols totaux et individuels des péricarpes des grenades : la localisation "Be", les localisations "Pu", "Co", "Re" et les localisations "Sa", "Du" (figure 3.11-A). La localisation "Be" présente les valeurs les plus élevées de rendement en extractibles et teneurs en polyphénols totaux et punicalagine, avec en moyenne 63 %, 314 mg eag/g ms et 180 mg/g ms respectivement, et une teneur moyenne en acide ellagique (3,1 mg/g ms). Seule la variété Provence est cultivée sur cette parcelle, et d'après les résultats précédents cette variété présente les teneurs les plus élevées en rendement et teneurs en polyphénols totaux et punicalagine, ce qui explique les teneurs plus élevées de la parcelle. Les lieux de production "Sa" et "Du" sont caractérisés par des teneurs en polyphénols totaux, punicalagine et acide ellagique faibles avec des valeurs moyennes de 220 (212-227) mg eag/g ms, et 103 (95-111) et 2,9 (2,9-3,0) mg/g ms, respectivement. Les localisations "Pu", "Co" et "Re" ont des valeurs moyennes en polyphénols totaux et individuels, avec 296 mg eag/g ms polyphénols totaux, 144 mg/g ms punicalagine, 3,3 mg/g ms acide ellagique et 1,3 mg/g ms punicaline.

Par conséquent, les péricarpes de la parcelle "Be" semblent contenir plus de polyphénols totaux et punicalagine et moins d'acide ellagique et de punicaline que les parcelles avec des teneurs moyennes ("Pu", "Co" et "Re"). Ces péricarpes semblent aussi montrer des teneurs en polyphénols totaux, punicalagine et acide ellagique plus importantes que celles des parcelles "Sa" et "Du". En revanche, les péricarpes des grenades issues des parcelles "Sa" et "Du" semblent contenir moins de polyphénols totaux, punicalagine et acide ellagique, et les mêmes teneurs en punicaline que les parcelles avec des teneurs moyennes ("Pu", "Co" et "Re").

Pour le rendement en extractibles au méthanol, deux groupes de parcelles se dégagent : les localisations "Be", "Co" et "Du", et les localisations "Sa", "Pu" et "Re" (figure 3.11-B). Les rendements en extractibles des parcelles "Sa", "Pu" et "Re" sont faibles et compris entre 48 % et 52 %, soit 5 % de moins que les autres parcelles en moyenne.

Cette étude est la première à notre connaissance montrant l'évolution de la teneur en polyphénols des péricarpes de grenades Mollar de Elche et Provence cultivées sur plusieurs parcelles du sud de la France. Néanmoins, la région de culture des variétés Nimali et Wonderful, respectivement 3 et 2 parcelles au Sri-Lanka et au Mexique, a montré une influence significative sur les teneurs en polyphénols totaux et punicalagine des péricarpes des grenades, qui sont multipliées par 1,5-3 et 2 fois respectivement [199,205]. La variabilité observée dans notre étude entre les lots de péricarpes de grenades issues de plusieurs zones de culture correspond à celle retrouvée dans la littérature, avec des différences maximales observées en polyphénols totaux et punicalagine d'un facteur 1,4 et 1,8 respectivement.

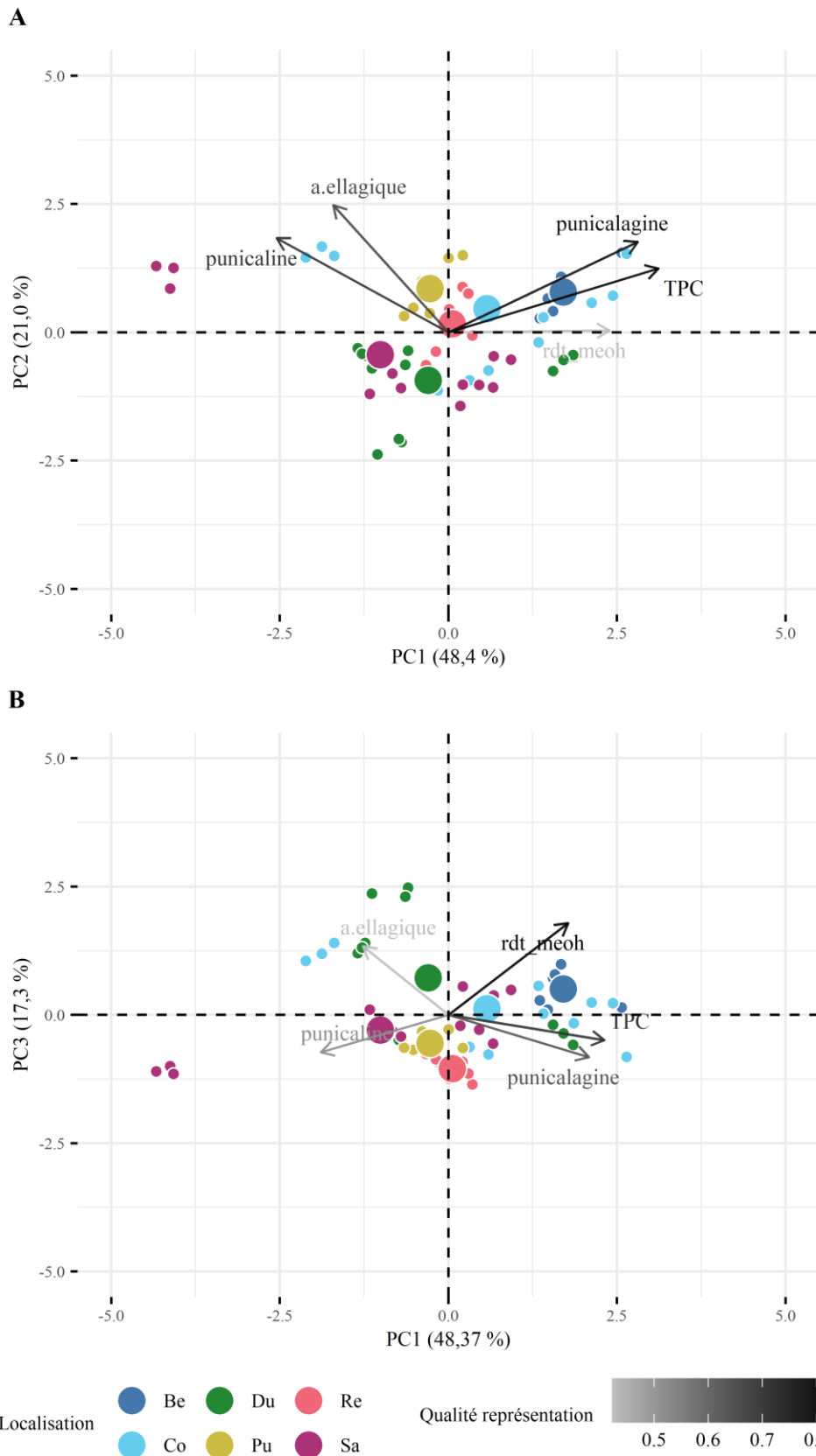


Figure 3.11 : Effet de la localisation des parcelles sur le rendement en extractibles et les teneurs en polyphénols totaux, punicalagine, punicaline et acide ellagique des péricarpes de grenades. Représentation sur les plans formés par les composantes PC1,PC2 et PC1,PC3 des individus et leur barycentre (points) et de leurs variables (composés). La qualité de la représentation des composés (vecteurs) sur les plans est donnée par un indice croissant de gris à noir, et la localisation est représentée en bleu (Be, n=6), cyan (Co, n=6), vert (Du, n=6), jaune (Pu, n=6), rose (Re, n=6), magenta (Sa, n=6).

### 3.3.1.a.iii. Effet du traitement foliaire

Le traitement foliaire contre l'éclatement montre aussi une influence sur les composés des péricarpes de grenades ( $p < 0,05$ , tableau 3.5), mais plus faible que celles de la variété ( $p < 0,001$ ) et de la localisation ( $p < 0,01$ ). Les échantillons sont présentés par lot traité ("Oui") et non traité ("Non") sur la figure 3.12.

Les lots traités ont des teneurs en polyphénols totaux et punicalagine moyenne de 281 mg eag/g ms et 141 mg/g ms, et les lots non traités 244 mg eag/g ms et 118 mg/g ms, respectivement. Ces teneurs sont 15 % et 19 % plus hautes, respectivement, dans les péricarpes de grenades traitées. Les lots non traités contiennent plus de punicaline et acide ellagique, avec des teneurs respectives moyennes de 1,5 et 3,4 mg/g ms contre 1,2 et 2,8 mg/g ms pour les lots traités ce qui représente une diminution après traitement foliaire de 20 %. Les rendements en extractibles au méthanol semblent en revanche similaires, avec des valeurs moyennes de 55 % et 54 % pour les lots non traités et traités respectivement. Le traitement foliaire contre l'éclatement à base de sulfate de zinc et de bore appliqué sur les parcelles semble donc entraîner une faible augmentation des polyphénols totaux et de la punicalagine, ainsi qu'une diminution des teneurs en acide ellagique et punicaline, mais ne semble pas influencer le rendement en extractibles au méthanol.

Deux études mettant en jeu l'application foliaire de zinc et de bore sur des grenadiers ont été produites ces dernières années [40,188]. L'effet de ce traitement a été évalué sur les caractéristiques qualitatives des fruits (volume, masse, proportion de jus, graines, péricarpes, etc.) et chimiques du jus extrait des graines (pH, teneurs en sucres, acide ascorbique, polyphénols totaux, anthocyanines totales, etc.). Dans la première étude, la teneur en polyphénols du jus est augmentée jusqu'à 1 % après application foliaire de chélates de zinc et de bore. [40]. Dans la seconde, le traitement foliaire de sulfate de bore et d'acide borique a été appliqué sur trois variétés de grenades, et la teneur en polyphénols évaluée dans le jus extrait à partir des graines. En moyenne sur les variétés, l'application de zinc et de bore augmente la teneur en polyphénols totaux du jus de 5 à 7 % [188]. En supposant que l'apport de bore et de zinc ait un effet similaire sur les teneurs en polyphénols dans les graines et le péricarpe de la grenade, nos résultats sont cohérents avec ceux de la littérature avec une augmentation de la teneur en polyphénols totaux après traitement à base de bore et de zinc.



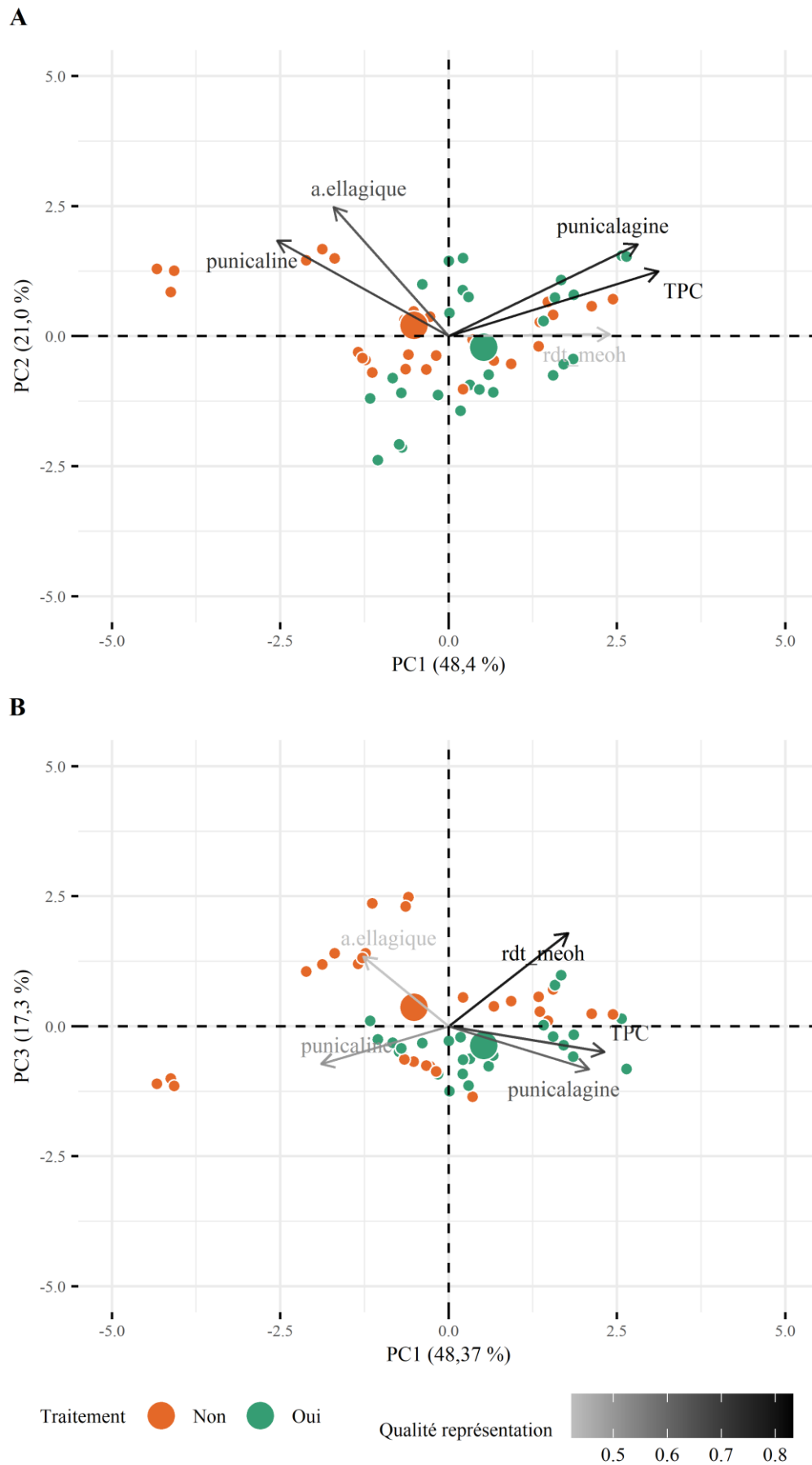


Figure 3.12 : Effet du traitement foliaire sur le rendement en extractibles et les teneurs en polyphénols totaux, punicalagine, punicaline et acide ellagique des péricarpes de grenades. Représentation sur les plans formés par les composantes PC1,PC2 et PC1,PC3 des individus et leur barycentre (points) et de leurs variables (composés). La qualité de la représentation des composés (vecteurs) sur les plans est donnée par un indice croissant de gris à noir, les lots non traités représentés en orange (n=27) et traités en turquoise (n=27).

### 3.3.1.a.iv. Conclusion

Nous avons montré que la variété de grenade, le lieu de culture et le traitement foliaire contre l'éclatement ont tous un effet sur la composition chimique des péricarpes de grenades. Les variations observées sur les extractibles totaux extraits au méthanol ne sont pas directement liées aux différents teneurs en polyphénols. Sachant que ces composés ne représentent environ que la moitié des extractibles, d'autres molécules contenues dans la fraction restante (51 %) peuvent expliquer ces variations.

La variété Provence a, en moyenne, des plus hauts teneurs en extractibles totaux, polyphénols totaux, punicalagine et des plus faibles teneurs en punicaline et acide ellagique.

La localisation "Be" se dégage en ce qui concerne des hauts teneurs en polyphénols, et cela pourrait résulter de la culture mono-variétale sur la parcelle avec la variété Provence. Sur les autres localisations, "Sa" et "Du" présentent les teneurs les plus faibles en polyphénols, alors que les localisations "Sa", "Pu" et "Re" montrent les valeurs les plus basses d'extractibles. Ces résultats confirment une tendance différente entre les extractibles totaux et les composés ciblés, les polyphénols. Il serait donc plus pertinent, dans les études ultérieures, d'évaluer la teneur en polyphénols totaux plutôt que le rendement d'extraction lorsqu'il s'agit de valoriser les polyphénols des péricarpes de grenades.

Le traitement contre l'éclatement a, en moyenne, un effet bénéfique sur le rendement en extractibles ainsi que les teneurs en polyphénols totaux et punicalagine, mais délétère sur les teneurs en punicaline et acide ellagique.

La communauté scientifique s'accorde sur un effet non négligeable de la variété ou du lieu de culture des grenades sur la teneur en composés à valeur ajoutée des co-produits de grenades. Les résultats des études les plus récentes sont présentés dans le tableau 3.6. Les variations observées des teneurs en polyphénols totaux et individuels des péricarpes de grenades résultent donc de plusieurs facteurs ce qui explique les différences observées entre notre étude et celle de Balli et al. [286] comparant les variétés Provence et Mollar de Elche. Les interactions entre les effets de la variété et de la localisation sur les polyphénols des péricarpes de grenades n'ont pas encore été étudiées à notre connaissance. Par conséquent, l'effet de la variété, du lieu de culture et du traitement foliaire sera développée dans la partie suivante. La punicalagine étant le polyphénol majoritaire des péricarpes et sa teneur décrivant au mieux les différences entre les lots de péricarpes, la teneur en punicalagine a été sélectionnée pour approfondir les effets des conditions de culture en tenant compte de leur interaction.

Tableau 3.6 : Données bibliographiques des effets de la variété et de la région de culture des grenades sur la teneur en polyphénols des péricarpes.

Nombre variétés	Nombre parcelles	Evolution des teneurs en polyphénols des péricarpes	Référence
15	1	Polyphénols totaux de 106 à 263 mg eag/g ms* Ellagitannins de 35 à 125 mg/g ms* Anthocyanes de 0 à 1 mg/g ms* Punicalagine de 12,8 à 105,25 mg/g ms* Acide ellagique de 0,07 à 0,48 mg/g ms*	[286]
4	1	Polyphénols totaux similaires 57 mg eag/g mh Flavonoïdes totaux de 4 à 5 mg ec/g mh Anthocyanes de 105 à 233 µg ec3g/g mh	[55]
7	1	Polyphénols totaux de 115 à 249 mg gae/g ms Punicalagine de 41,1 à 57,6 mg/g ms Acide ellagique de 2,1 à 5,3 mg/g ms Acide ellagique hexoside de 3,0 à 6,3 mg/g ms Pédunculagine de 8,2 à 11,8 mg/g ms β-punicaline de 3,1 à 7,1 mg/g ms	[307]
1	3	Flavonols totaux de 25 à 45 mg er/g* Flavonoïdes totaux de 36 à 54 mg er/g* Polyphénols totaux de 276 à 413 mg eag/g*	[308]
1	3	Polyphénols totaux similaire 217 mg eag/g ms* Flavonoïdes totaux de 52,12 à 62,63 mg er/g ms* Punicalagine de 328,87 à 371,30 mg/g ms* Acide ellagique de 21,14 à 25,00 mg/g ms* Acide gallique de 1,86 à 2,23 mg/g ms*	[204]

mg eag/g mh : mg eag/g de matière humide - mg ec/g mh : mg d'équivalent catéchine/g de matière humide - µg ec3g/g mh : µg d'équivalent cyanidine-3-glucoside/g de matière humide - mg er/g : mg d'équivalent rutine/g - \*dans l'extrait

### 3.3.1.b. Influence de la variété, la localisation et le traitement sur la teneur en punicalagine

La teneur en punicalagine explique principalement les variations entre les échantillons et a donc été sélectionnée pour la suite de l'analyse de l'effet des conditions de culture sur les polyphénols des péricarpes. En effet, le rendement en extractibles au méthanol ne semble pas lié aux teneurs en polyphénols ; les teneurs en punicaline et polyphénols totaux sont corrélées (négativement ou positivement) avec la teneur en punicalagine ; et la teneur en acide ellagique est négligeable comparée à la teneur en punicalagine.

L'analyse de la variance (ANOVA, 3 facteurs "variété", "traitement", "localisation", seuil significativité 5 %) montre une interaction statistiquement significative ( $p < 0,001$ ) entre les effets de chacun des facteurs discriminant les lots de péricarpes (variété, localisation, traitement) sur la teneur en punicalagine. Autrement dit :

- (i) l'effet de la variété sur la teneur en punicalagine dépend de la localisation et du traitement,
- (ii) l'effet de la localisation sur la teneur en punicalagine change en fonction de la variété et du traitement considérés, et
- (iii) l'effet du traitement sur la teneur en punicalagine n'est pas le même selon le lieu de production et la variété.

Les différences significatives observées pour chacun des trois facteurs (variété, localisation, traitement) sont données dans les figures 3.13, 3.14, et 3.16.

### 3.3.1.b.i. Effet de la variété sur la teneur en punicalagine

L'effet de la variété sur la teneur en punicalagine des péricarpes de grenades ne peut être évaluée que sur les lieux de production "Co", "Du" et "Sa" où les deux sont cultivées (figure 3.13). Sur ces parcelles, il y a une interaction statistiquement significative entre la variété, le lieu de production et le traitement sur la teneur en punicalagine (ANOVA, 3 facteurs "variété", "producteur", "traitement", seuil de significativité 5 %,  $p < 0,001$ ). De plus, pour les lots des parcelles non traitées et traitées, il y a une interaction significative entre le lieu de production et la variété ( $p < 0,05$  et  $p < 0,01$ , respectivement). La variété a donc un effet sur la teneur en punicalagine des péricarpes qui dépend de la parcelle, que les grenadiers aient été traités ou non.

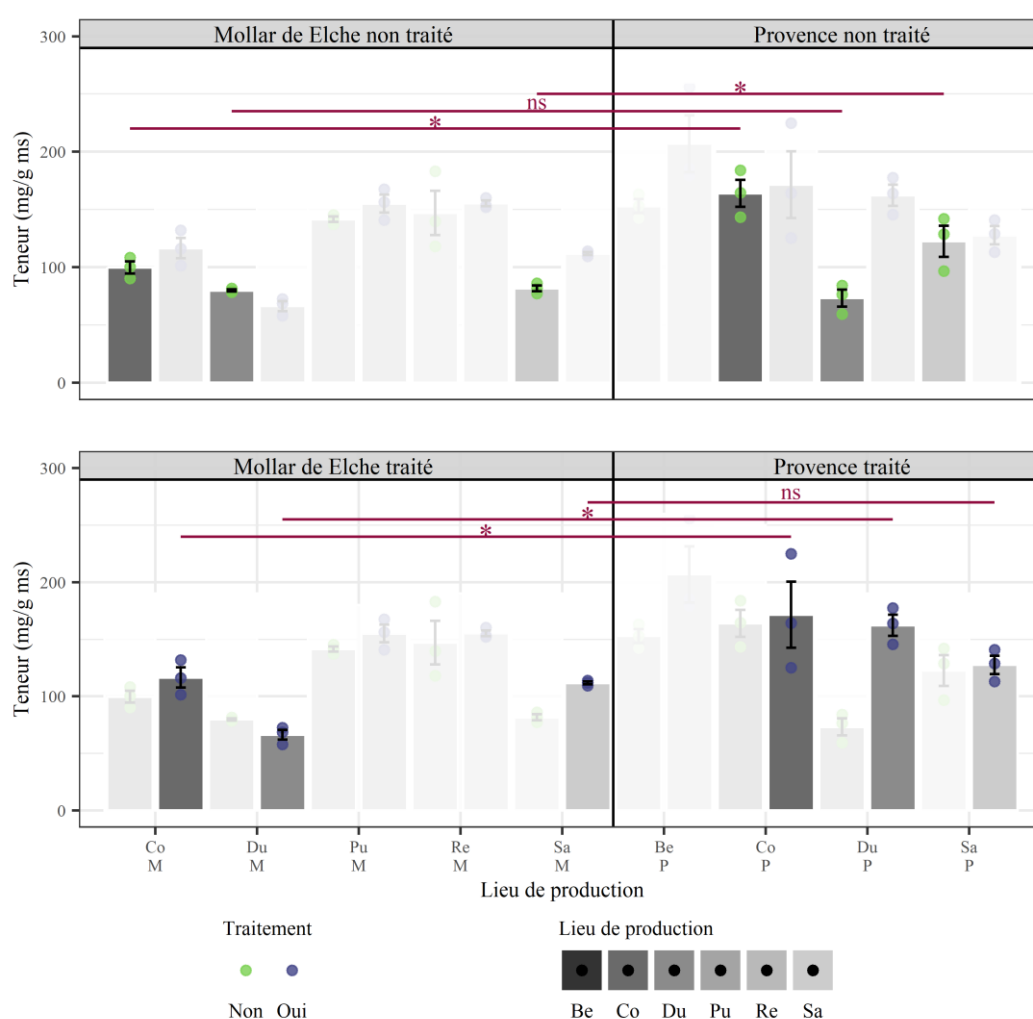


Figure 3.13 : Effet de la variété sur la teneur en punicalagine des péricarpes de grenades. La teneur en punicalagine (mg/g ms) des échantillons est représentée par des points vert (lots non traités,  $n=3$ ) ou violet (lots traités,  $n=3$ ) par variété. Les moyennes (barres) sont colorées de gris foncé à gris clair pour, dans l'ordre, les parcelles "Be", "Co", "Du", "Pu", "Re", "Sa". Les teneurs en punicalagine des péricarpes des lots ne pouvant être comparés sont grisées. La significativité est représentée par les symboles "ns" : non significatif, "\*" : significatif  $p < 0,05$ , "\*\*" : significatif  $p < 0,01$ , "\*\*\*" : significatif  $p < 0,001$ , "\*\*\*\*" : significatif  $p < 0,0001$ .

Pour les lots non traités des parcelles “Co” et “Sa”, la variété influence significativement la teneur en punicalagine des péricarpes ( $p < 0,001$  et  $p < 0,05$ , respectivement), alors que pour la parcelle “Du” il n’y a pas de différence significative entre les deux variétés ( $p > 0,05$ ). Les différences moyennes significatives de teneur en punicalagine entre les deux variétés sur les parcelles non traitées “Co” et “Sa” sont respectivement -64 et -41 mg/g ms. La variété Mollar de Elche contient donc moins de punicalagine que la variété Provence sur les parcelles “Co” et “Sa”, avec, en moyenne, une teneur 39 et 34 % plus faible.

Pour les lots traités, la teneur en punicalagine varie significativement entre les deux variétés des parcelles “Co” et “Du” ( $p < 0,01$  et  $p < 0,0001$ ) et est similaire pour les lots de la parcelle “Sa” ( $p > 0,05$ ). Sur les parcelles traitées “Co” et “Du”, la différence moyenne significative de teneur en punicalagine est de -54 et -96 mg/g ms entre les variétés. Par conséquent, Mollar de Elche présente 32 et 59 % de punicalagine en moins que Provence pour les parcelles “Co” et “Du” traitées.

La variété Provence contient donc plus de punicalagine que la variété Mollar de Elche, si les grenades sont cultivées sur les parcelles non traitées “Co” et “Sa” ou sur les parcelles traitées “Co” et “Du”. L’effet de la variété est résumé sur le tableau 3.7. Les effets respectifs de la localisation des vergers et du traitement foliaire seront abordés dans les parties suivantes. En particulier, l’effet du traitement foliaire pourrait expliquer les tendances observées, puisque les variétés ont été comparées par parcelle. Par exemple, si le traitement augmente la teneur en punicalagine, alors les péricarpes Mollar de Elche non traitée avec une teneur inférieure à celle de Provence non traitée pourraient montrer une teneur équivalente lorsque les grenades sont traitées.

Tableau 3.7 : Effet de la variété de grenade sur la teneur en punicalagine des péricarpes par localisation et traitement. Seules les parcelles sur lesquelles sont cultivées les deux variétés ont été sélectionnées.

<b>Variété(s) avec une teneur maximale en punicalagine</b>			
Parcelle	Co	Du	Sa
Non traité	Provence	Provence ou Mollar de E.	Provence
Traité	Provence	Provence	Provence ou Mollar de E.

Comme établi dans la partie précédente, les variations des teneurs en punicalagine sont similaires à celles des teneurs en polyphénols totaux. Les tendances d’évolution de la punicalagine sont donc transposables aux teneurs en polyphénols totaux.

Dans la plupart des études comparant différentes variétés de grenades, les différences phénotypiques sont attribuées à la génétique lorsque les conditions culturales sont identiques [316]. Des études complémentaires récentes ont validé ces observations en démontrant une grande diversité génétique entre les variétés de grenade [200,317]. Les variations génétiques pourraient par conséquent expliquer celles des teneurs en polyphénols des péricarpes des deux variétés de cette étude. Dans les plantes, la voie de biosynthèse des tannins hydrolysables dont font partie les ellagitannins dérive de la voie de l’acide shikimique (ou shikimate) à partir du 3-déshydroshikimate (3-DHS) et n’a pas encore été totalement élucidée à ce jour [318]. Les deux premières étapes de transformation du 3-déshydroshikimate (3-DHS) à l’acide gallique (AG) puis à la  $\beta$ -glucogalline ( $\beta$ -GG) sont effectuées par une shikimate déshydrogénase (SDH) et une

UDP-glycosyltransférase (UGT), puis des additions de groupements galloyl par des acyltransférases (ou galloyltransférases) permettraient d'obtenir le pentagalloylglucose, qui s'oxyderait par la suite *via* une phénol oxydase pour former les tannins hydrolysables dont les ellagitannins. La grande diversité d'ellagitannins identifiés à ce jour, Brighenti et al. ont décrit 50 composés dans les péricarpes de grenades [142], suggère que leur voie de biosynthèse est complexe et demande de nombreux travaux pour être décrite en intégralité. Plusieurs études ont porté sur l'identification des gènes régulant l'expression des enzymes de la grenade impliquées dans la synthèse des ellagitannins par analogie de séquence [198,201,319] et biologie moléculaire [320–322]. Harel-Beja et al. [201] ont utilisé ces outils et l'analyse des polyphénols pour comparer deux variétés de grenades originaires d'Espagne et d'Israël avec deux phénotypes distincts (couleur de l'exocarpe et des graines, propriétés organoleptiques des graines) et des périodes de développement différentes (maturité atteinte en début ou fin de saison). L'expression de 12 882 gènes varie entre les deux variétés, et des différences significatives des teneurs en polyphénols (anthocyanes, flavonoïdes, ellagitannins) des péricarpes ont été détectées et corrélées avec des séquences codant pour des facteurs de transcription ou des enzymes du métabolisme des polyphénols [201]. Les variations de la transcription de ces séquences expliquent les variations des teneurs en punicalagine des deux variétés. La variabilité génétique entre les variétés de grenades a par conséquent un effet sur les teneurs en polyphénols des péricarpes. La plus haute teneur en punicalagine des péricarpes de la variété Provence pourrait donc résulter de différents niveaux d'expression des enzymes impliquées dans la biosynthèse des ellagitannins.

### 3.3.1.b.ii. Effet des conditions pédoclimatiques sur la teneur en punicalagine

L'effet de la localisation des parcelles a été étudié sur les deux variétés Mollar de Elche et Provence séparées, en tenant compte du traitement appliqué (figure 3.14).

Pour Mollar, seul le lieu de production influence la teneur en punicalagine ( $p < 0,0001$ ). Après des comparaisons deux à deux, il apparaît que les péricarpes des localisations (Du,Pu), (Du,Re), (Pu,Sa), et (Re,Sa) contiennent des teneurs en punicalagine significativement différentes ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,05$ , et  $p < 0,05$  respectivement), alors que les lieux (Co,Du) (Co,Pu), (Co,Re), (Co,Sa) (Du,Sa) et (Pu,Re) entraînent des teneurs non significativement différentes ( $p > 0,05$ ). Les différences moyennes significatives des teneurs en punicalagine entre les parcelles (Du,Pu), (Du,Re), (Pu,Sa), et (Re,Sa) sont respectivement de -75, -78, 51 et 54 mg/g ms. Les localisations "Re" et "Pu" entraînent donc des teneurs en punicalagine significativement plus élevées que "Du" et "Sa". La teneur en punicalagine de la localisation "Co" n'est pas significativement différente des quatre autres localisations.

Pour Provence, l'effet du lieu de production est plus complexe car dépend du traitement appliqué sur les grenadiers (ANOVA 2 facteurs "producteur" "traitement", seuil de significativité 5 %,  $p < 0,05$ ). Par conséquent l'effet des lieux de production sera étudié pour les lots non traités et traités séparément. Il y a un effet principal significatif de la parcelle sur la teneur en punicalagine des lots non traités et traités ( $p < 0,001$ ). Le lieu de production a donc un effet significatif sur la teneur en punicalagine des co-produits de grenade de la variété Provence non traitée et traitée.

Les péricarpes des grenades Provence non traitées cultivées sur les parcelles (Be,Du) et (Co,Du) ont des teneurs en punicalagine significativement différentes ( $p < 0,001$ ), alors que celles des parcelles (Be,Co), (Be,Sa), (Co,Sa) et (Du,Sa) ne sont pas significativement distinctes. Les différences moyennes significatives entre les parcelles “Be” et “Du”, et “Co” et “Du” sont respectivement de -80 et -91 mg/g ms. Les péricarpes de grenades non traitées issus des parcelles “Be” et “Co” ont donc une teneur en punicalagine supérieure à celles des péricarpes issus de la parcelle “Du”.

En revanche, pour les lots de grenades Provence traitées, les péricarpes des grenades issues des parcelles (Be,Sa) montrent des teneurs en punicalagine significativement différentes ( $p < 0,001$ ), alors que les péricarpes issus des parcelles (Be,Co), (Be,Du), (Co,Du), (Co,Sa) et (Du,Sa) ont des teneurs non significativement différentes ( $p > 0,05$ ). Les parcelles “Be” et “Sa” ont une différence moyenne significative de -79 mg/g ms, ce qui signifie que les péricarpes issus des grenades traitées de la parcelle “Be” ont une teneur en punicalagine plus élevée que ceux de la parcelle “Sa”.

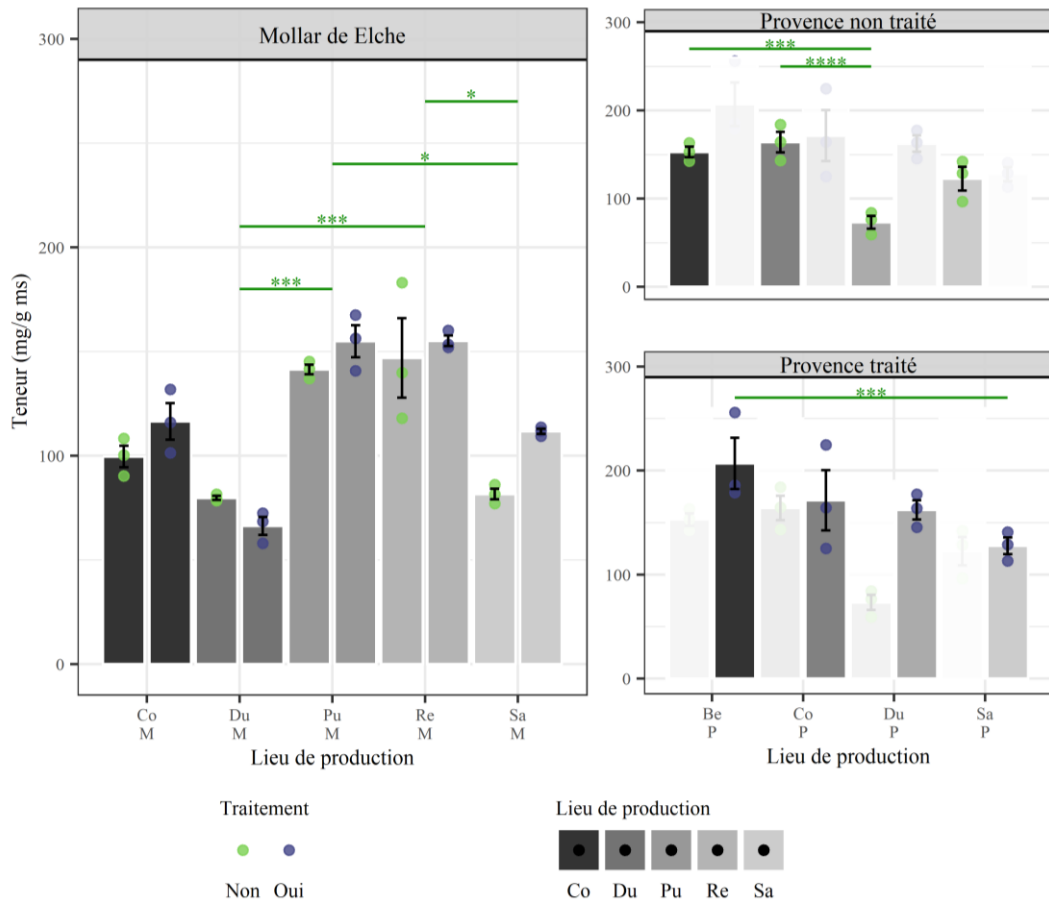


Figure 3.14 : Effet de la localisation des vergers sur la teneur en punicalagine des péricarpes de grenades. La teneur en punicalagine (mg/g ms) des échantillons est représentée par des points vert (lots non traités,  $n=3$ ) ou violet (lots traités,  $n=3$ ) par variété. Les moyennes (barres) sont colorées de gris foncé à gris clair pour, dans l'ordre, les parcelles “Be”, “Co”, “Du”, “Pu”, “Re”, “Sa”. Les teneurs en punicalagine des péricarpes des lots ne pouvant être comparés sont grisées. La significativité est représentée par les symboles “ns” : non significatif, “\*” : significatif  $p < 0,05$ , “\*\*” : significatif  $p < 0,01$ , “\*\*\*” : significatif  $p < 0,001$ , “\*\*\*\*” : significatif  $p < 0,0001$ . Les différences non significatives ne sont pas représentées.

L'effet de la localisation des parcelles est présenté dans le tableau 3.8. Les péricarpes de la variété Provence des parcelles “Be” et “Co” ont une teneur en punicalagine supérieure à ceux de la parcelle “Du” lorsque les grenades ne sont pas traitées. Lorsqu'elles sont traitées, les péricarpes de la parcelle “Be” contiennent plus de punicalagine que ceux de “Sa”. Ces écarts peuvent être expliqués par l'effet du traitement foliaire, qui sera développé dans la partie ci-après. En revanche, les péricarpes de la variété Mollar de Elche des parcelles “Re” et “Pu” contiennent plus de punicalagine que ceux des parcelles “Du” et “Sa”. Ceux de la parcelle “Co” ont des teneurs équivalentes à ceux de toutes les autres parcelles. Pour les deux variétés, les teneurs les plus faibles en punicalagine sont retrouvées dans les péricarpes de grenades de la parcelle “Du” et dans une certaine mesure de la parcelle “Sa”. Les parcelles “Pu”, “Re” pour Mollar et “Be”, “Co” pour Provence sont celles où les teneurs en punicalagine sont les plus hautes.

Tableau 3.8 : Effet de la localisation des parcelles de grenades sur la teneur en punicalagine des péricarpes par variété et traitement.

Variété	Traitement	Parcelle					
		Be	Co	Du	Pu	Re	Sa
Mollar de Elche	Non	na	ns	-	+	+	-
	Oui	na	ns	-	+	+	-
Provence	Non	+	+	-	na	na	ns
	Oui	+	ns	ns	na	na	-

na : non applicable, ns : effet non significatif.

D'après les résultats de ces travaux et ceux de la littérature [199,205], le lieu de production des grenades influence la teneur en punicalagine des péricarpes de grenades. Les liens entre cette teneur et la teneur en polyphénols totaux des péricarpes impliquent que l'évolution de la première est transposable à la seconde.

En horticulture, la charge des arbres revêt une importance particulière sur le développement des fruits [323] mais aussi sur leur profil métabolique. La réduction de la charge du grenadier sur la qualité des fruits et du jus a été étudiée sur plusieurs variétés de grenades [324,325]. Le volume et la masse des grenades sont augmentés par l'éclaircissage, alors que la composition du jus semble évoluer selon la variété considérée. La teneur en polyphénols totaux du jus de la variété Malase Yazdi (Iran) n'est pas affectée par la charge des arbres alors que celles des variétés Wonderful et Mollar de Elche (Espagne) diminuent, sans que la teneur en punicalagine ne change. La punicalagine n'étant pas le polyphénol majoritaire du jus des graines de grenades, il semble cohérent que sa teneur évolue peu. Les teneurs en glucides (glucose, fructose), acides organiques (ascorbique, citrique) et composés volatils des jus sont aussi affectés par l'éclaircissage en fonction de la variété. Sur les six parcelles étudiées dans nos travaux, certaines ont été affectées par les gelées tardives en 2019 ayant conduit à des dommages dans les vergers et une plus faible charge des arbres. Cela pourrait expliquer partiellement les différences de teneur en polyphénols totaux observées entre les parcelles pour les deux variétés.

De plus, la régulation de la production des polyphénols dans les plantes est liée notamment au stade de développement, au type de sol et la disponibilité des nutriments, aux facteurs de stress, à la température durant le développement, et à



l'intensité et le type de lumière [326]. Le stade de développement des grenades est lié à la maturité des fruits qui peut être mesurée avec la couleur des fruits, et a été défini pour la variété Mollar de Elche dans des études précédentes [296].

Comme discuté dans la première partie de ce chapitre, d'après les couleurs des grenades Mollar de Elche mesurées avec les coordonnées de l'espace de couleurs CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$  et  $b^*$ ), il semblerait que certains fruits de la parcelle "Sa" soient immatures. Les teneurs en polyphénols plus faibles des péricarpes de la variété Mollar de Elche cultivée sur cette parcelle pourraient résulter partiellement de cette différence de maturité. Néanmoins, les teneurs sont aussi minimales pour les grenades cultivées sur la parcelle "Du", pourtant les données colorimétriques indiquent une maturité totale des fruits. Les autres conditions environnementales ne semblant pas être impliquées dans les variations des teneurs en polyphénols totaux et punicalagine sont le type de sol et le stress hydrique. En effet, les sols des différentes parcelles sont tous limoneux avec des composantes argileuses et sableuses plus ou moins prononcées, ce qui constitue des textures équilibrées pour l'agriculture [327] sensiblement similaires, et l'irrigation a été mise en place si nécessaire.

Les données climatiques des stations météorologiques à proximité des parcelles ont permis d'établir la corrélation existante entre la teneur en punicalagine et la température durant le développement des grenades. La figure 3.15-A présente l'évolution des températures minimales pendant le développement des grenades, c'est à dire entre le 30/04/2019 et le 09/10/2019. Les températures minimales ont été moyennées sur la période de fructification des grenades et corrélées avec la teneur en punicalagine des péricarpes des deux variétés non traitées (figure 3.15-B) et traitées (figure 3.15-C). Les évolutions des températures moyennes et maximales ainsi que leurs corrélations avec la teneur en punicalagine des péricarpes de grenades sont données en Annexe.

Les teneurs en punicalagine des péricarpes des variétés Mollar de Elche et Provence pourraient être positivement corrélées aux températures minimales locales (coefficient de Pearson  $R=0,83$  et  $R=0,93$ ,  $p<0,1$ ). De manière similaire, les péricarpes de la variété Mollar des lots traités semblent corrélés positivement avec les températures minimales. La tendance différente des teneurs des lots de péricarpes de la variété Provence traitée est expliquée par l'effet du traitement sur certaines des parcelles. Il semblerait donc que des températures minimales plus élevées pendant le développement des grenades entraînent des teneurs plus élevées en punicalagine dans les péricarpes, ou que des températures plus faibles diminuent la teneur en punicalagine des péricarpes. Les stations météorologiques correspondant aux températures minimales les plus élevées sont Béziers et Corbère les Cabannes où sont situées les parcelles "Co", "Pu" et "Re" avec des températures comprises entre 2-4 et 25-27 °C sur la période sélectionnée, en moyenne 14-16 °C. Hernandez et al. [205] ont décrit le phénomène inverse pour la variété Wonderful cultivée dans deux régions de l'état de Chihuahua au Mexique, et ont conclu que les températures plus basses induisent un stress qui promeut l'accumulation des polyphénols dans les fruits. Cependant Attanayake et al. [199] ont montré une accumulation de polyphénols et punicalagine lorsque les grenades Nimali (Sri Lanka) sont cultivées dans une région plus chaude (26-28 °C) et moins humide (76-91 % d'humidité relative). Les corrélations ont été effectuées avec peu d'échantillons (entre 4 et 6) dans nos travaux

et ceux cités, les résultats sont donc à confirmer avec des études sur un plus long terme. Une étude récente a mis en évidence l'impact des conditions topo-climatiques de culture de vignes sur le profil métabolique des grains de raisin [328]. Les teneurs en polyphénols de l'enveloppe des grains de raisin varient en fonction de la variété considérée, de la saison et des conditions climatiques. Les différences les plus marquées entre les variétés sont obtenues sur la parcelle avec la température moyenne 1,5 °C plus chaude, en raison d'une potentielle dégradation des polyphénols liée à un stress oxydant engendré par l'augmentation de la température. Les sensibilités variables des variétés de grenades de cette étude (Provence, Mollar de Elche) et des études antérieures (Nimali, Wonderful) pourraient donc aussi être à l'origine des évolutions contradictoires des teneurs en polyphénols observées. Sans connaître les mécanismes et les tendances exactes, il semble néanmoins certain que le métabolisme des polyphénols dans les grenades soit impacté par la région de culture ainsi que la variété.

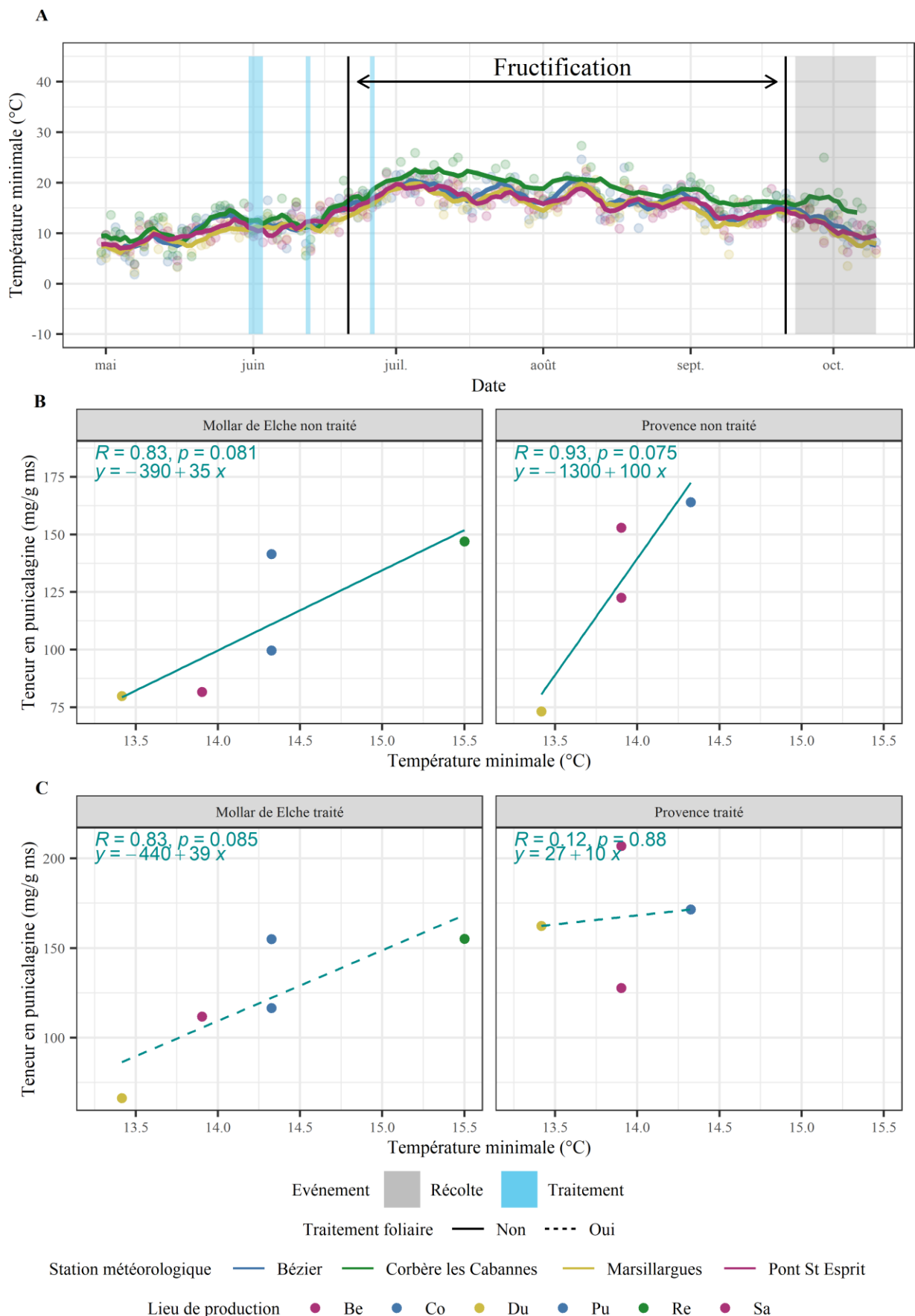


Figure 3.15 : Relation entre la teneur en punicalagine des péricarpes de grenades non traitées (B) et traitées (C) et les températures ambiantes minimales mesurées sur les parcelles (A). Les parcelles sont colorées par station météorologique “Bézier” (“Co” et “Pu”) en bleu, “Corbère les Cabannes” (“Re”) en vert, “Marsillargues” (“Du”) en jaune et “Pont St Esprit” (“Be”, “Sa”) en rose. La corrélation entre la température et la teneur en punicalagine est représentée en bleu, en traits pleins pour les lots de grenades non traitées (n=4 ou 5), et en traits pointillés pour les lots traités (n=4 ou 5).

### 3.3.1.b.iii. Effet du traitement foliaire sur la teneur en punicalagine

Les variétés Mollar de Elche et Provence ont été séparées comme précédemment pour analyser l'effet du traitement (figure 3.16).

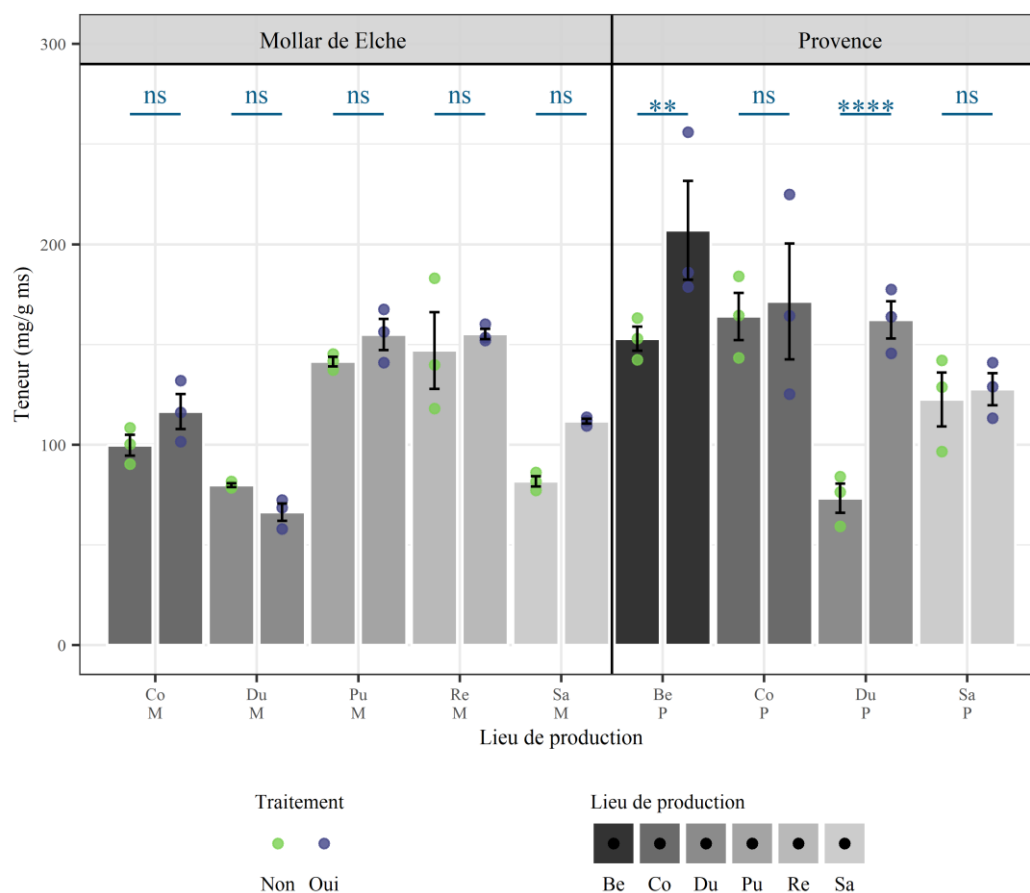


Figure 3.16 : Effet du traitement foliaire contre l'éclatement sur la teneur en punicalagine des péricarpes de grenades. La teneur en punicalagine (mg/g ms) des échantillons est représentée par des points vert (lots non traités,  $n=3$ ) ou violet (lots traités,  $n=3$ ) par variété. Les moyennes (barres) sont colorées de gris foncé à gris clair pour, dans l'ordre, les parcelles "Be", "Co", "Du", "Pu", "Re", "Sa". Les teneurs en punicalagine des péricarpes des lots ne pouvant être comparés sont grisées. La significativité est représentée par les symboles "ns" : non significatif, "\*" : significatif  $p<0,05$ , "\*\*" : significatif  $p<0,01$ , "\*\*\*" : significatif  $p<0,001$ , "\*\*\*\*" : significatif  $p<0,0001$ .

L'analyse de la variance (ANOVA, 2 facteurs "traitement" et "localisation", seuil de significativité 5 %) montre que le traitement et la localisation n'interagissent pas significativement pour la variété Mollar de Elche ( $p>0,05$ ), et que le traitement n'a pas d'effet significatif sur la teneur en punicalagine ( $p>0,05$ ) pour cette variété.

Pour Provence, l'effet du traitement des grenades dépend du lieu de production ( $p<0,0001$ ), ce qui signifie que le traitement foliaire influence la teneur en punicalagine des grenades issues de certaines localisations seulement. Les teneurs en punicalagine des péricarpes de la variété Provence ont été séparées par lieu de production, et l'analyse de la variance (ANOVA, 1 facteur "traitement", seuil de significativité 5 %) montre un effet principal statistiquement significatif du traitement pour les localisations "Be" et "Du" uniquement ( $p_{Be}<0,01$  et  $p_{Du}<0,0001$ ), et non significatif

pour “Co” et “Sa” ( $p > 0,05$ ). Le traitement a donc un effet sur la teneur en punicalagine des co-produits de grenade de la variété Provence des parcelles “Be” et “Du”, et n’influence pas cette teneur pour les grenades cultivées sur “Co” et “Sa”. La différence moyenne significative de teneur en punicalagine entre un lot non traité et traité des localisations “Be” et “Du” sont +54 et +90 mg/g ms, par conséquent le traitement entraîne une augmentation de cette teneur.

Le traitement foliaire bore et zinc des grenades a un effet bénéfique sur la teneur en punicalagine des péricarpes de la variété Provence pour deux parcelles (“Be” et “Du”) sur quatre étudiées, et n’influence pas la teneur de la variété Mollar de Elche. Ces effets sont résumés dans le tableau **3.9**.

L’absence d’effet du traitement sur la variété Mollar de Elche et son impact bénéfique sur certaines parcelles de Provence explique les écarts observés précédemment entre les deux variétés.

En effet, sur la parcelle “Co”, les teneurs en punicalagine des péricarpes de Mollar de Elche et Provence ne sont pas influencées par le traitement, il est donc cohérent que la même tendance soit retrouvée entre les variétés des lots traités et non traités, avec une teneur 32 à 39 % plus faible de la variété Mollar de Elche. La variété Provence de la parcelle “Du” contient plus de punicalagine lorsqu’elle est traitée (+90 mg/g ms) alors que la variété Mollar de Elche de cette même parcelle a une composition similaire avec ou sans le traitement foliaire. Il semble donc logique que malgré une teneur en punicalagine similaire entre les variétés non traitées, une différence apparaisse pour les lots traités. Le traitement foliaire n’affecte pas les teneurs en punicalagine des variétés Mollar de Elche et Provence sur la parcelle “Sa”. Néanmoins, la comparaison des variétés par lot traité et non traité montre que les lots non traités de la variété Mollar de Elche ont une teneur en punicalagine plus faible que Provence, et cette différence n’est pas retrouvée pour les lots traités. En moyenne, les péricarpes de la parcelle “Sa” non traités contiennent 82 et 123 mg/g ms de punicalagine pour Mollar de Elche et Provence, respectivement, alors que les lots traités contiennent respectivement 112 et 128 mg/g ms. La tendance semble similaire entre les lots avec une teneur en punicalagine plus faible pour la variété Mollar de Elche, bien qu’elle ne soit pas significative pour les lots traités.

Etant donné que la teneur en punicalagine et la teneur en polyphénols totaux sont corrélées positivement, nous avons comparé les teneurs en polyphénols totaux de la même manière que précédemment sur cette parcelle. Les résultats montrent que la teneur en polyphénols totaux est significativement plus faible pour la variété Mollar de Elche que pour Provence des lots non traités ( $p < 0,0001$ ) et traités ( $p < 0,0001$ ). Il semblerait donc que la variation de la teneur en punicalagine soit plus faible que celle de la teneur en polyphénols totaux, et afin d’établir si une différence de teneur en punicalagine existe ou non entre les deux variétés de cette parcelle, il faudrait réitérer l’expérience pour affiner les résultats.

L’effet du traitement foliaire explique aussi les résultats obtenus lorsque les localisations ont été comparées. En effet, le traitement promeut la teneur en punicalagine des péricarpes de Provence sur les parcelles “Be” et “Du”. La teneur en punicalagine du lot non traité de la parcelle “Du” est plus faible que sur les autres parcelles, alors que celle du lot traité n’est pas différente des autres parcelles. Le

traitement a donc augmenté la teneur en punicalagine des péricarpes de grenades de la parcelle “Du”, jusqu’à atteindre une teneur comparable aux autres parcelles. Le même phénomène explique que sur la parcelle “Sa”, la teneur en punicalagine est équivalente à “Be” pour les grenades non traitées, puis est inférieure à “Be” pour les lots traités car le traitement augmente la teneur en punicalagine des péricarpes des grenades Provence de la variété “Be”.

Tableau 3.9 : Effet du traitement foliaire sur la teneur en punicalagine des péricarpes par variété et traitement.

Variété	Be	Co	Du	Pu	Re	Sa
Mollar de Elche	na	ns	ns	ns	ns	ns
Provence	+	ns	+	na	na	ns

na : non applicable, ns : effet non significatif.

L’effet du traitement foliaire s’explique tout d’abord par l’absorption des éléments dans les feuilles de grenades. La pulvérisation foliaire de bore et de zinc a montré une augmentation de ces nutriments dans les feuilles de grenades [40,188], concomitante avec l’augmentation d’autres éléments comme le magnésium et le potassium [40] ou le fer, le manganèse et le cuivre dans une autre étude [188]. Les variations des nutriments autres que le bore et le zinc sont potentiellement due aux variations des conditions de culture employés dans les deux études (variété, localisation, méthodes culturales) mais aussi à l’emploi de deux formulations du traitement foliaire : sous forme de chélates de zinc et bore [40], ou de sulfate de zinc et d’acide borique [188].

Le rôle du bore dans les plantes comprend la synthèse des acides nucléiques et glucides, la régulation (promotion ou inhibition) de l’expression ou de l’activité d’enzymes impliquées dans le métabolisme ou le catabolisme de métabolites comme les polyphénols ou d’hormones comme l’auxine, et la stabilité des membranes cellulaires [329]. Cette complexité entraîne des effets physiologiques parfois encore incompris résultant d’une chaîne de réactions, de surexpression et de répression de voies métaboliques liées dans certaines études à l’altération des parois cellulaires engendrant une réponse au stress oxydant [330].

Ces effets physiologiques semblent dépendre de l’organe de la plante [331], mais aussi de la variété [332]. Dans les feuilles de citronnier, la déficience en bore entraîne une plus grande quantité de glucides que dans les racines, alors que dans les racines elle provoque une accumulation plus importante d’acides aminés et de composés aromatiques [331]. Sur l’olivier, cette déficience entraîne une augmentation des polyphénols et composés volatiles dans les feuilles [303,333], mais une diminution des polyphénols et tocophérols dans les fruits [303]. Dans les myrtilles, l’application foliaire de bore entraîne une diminution des polyphénols de la variété Bluecrop sans changer la teneur de la variété Reka, alors que les deux variétés montrent une augmentation des pectines [332].

La pulvérisation de bore sur le grenadier a été étudiée sur les métabolites contenus dans le jus [40,188], et selon les études, la teneur en glucide reste inchangée ou diminue alors que les teneurs en polyphénols totaux et anthocyanes totales restent constantes ou augmentent. De plus, il y aurait un effet variétal influençant l’impact du

traitement car les teneurs en glucides, polyphénols et anthocyanes totaux sont affectées différemment selon la variété considérée [188].

Le zinc est aussi un élément essentiel des cellules végétales car il est impliqué dans le métabolisme cellulaire par ses interactions avec les protéines, lipides membranaires et acides nucléiques [334]. Le zinc est retrouvé dans toutes les classes d'enzymes et de nombreuses protéines ont des sites spécifiques de liaison à cet élément ayant des fonctions structurelles, catalytiques ou cocatalytique. Les protéines contenant un domaine à doigt de zinc constituent la famille la plus large de protéines liées au zinc, et ont un rôle majeur dans la régulation de l'expression des gènes et des interactions entre protéines.

Par conséquent, l'apport de zinc est essentiel dans l'activité métabolique des cellules, qui se traduit par exemple dans la tomate par de plus hautes teneurs en vitamines, chlorophylles, flavonoïdes, caroténoïdes et polyphénols [335]. Dans la grenade, l'apport foliaire de zinc entraîne, selon les études, une diminution [188] ou une teneur similaire [40] en glucides totaux et une augmentation [188] ou une teneur similaire [40,336] en polyphénols et anthocyanes totales du jus, ou une teneur inchangée en polyphénols totaux des graines [203]. Aux conditions pédoclimatiques variables entre ces études, s'ajoute un effet variétal [188] qui provoquerait ces tendances différentes.

Les rôles du bore et du zinc dans le métabolisme des plantes sont complexes. Leur compréhension à l'échelle moléculaire nécessite des recherches approfondies sur l'interconnexion entre les voies métaboliques, qui sont de plus propres à chaque espèce végétale et parfois même au sein de chaque variété, et dépendent de facteurs agro-écologiques. Toutefois, les études sur la déficience ou l'apport foliaire de bore ou de zinc concordent sur leur implication dans la régulation du métabolisme des polyphénols, bien que les mécanismes sous-jacents ne soient pas encore élucidés.

Les études antérieures sur l'application foliaire de bore et de zinc sur le grenadier ont montré dans le jus des graines une augmentation des polyphénols totaux [40,188] et une teneur inchangée en anthocyanes totales [40,188]. Selon la variété de grenade, il semblerait cependant que les teneurs en polyphénols et anthocyanes totaux restent constantes ou augmentent avec le traitement [188]. En admettant que les mécanismes de régulation de la synthèse des polyphénols des graines et des péricarpes soient affectés de la même manière, ces résultats concordent avec notre étude montrant une augmentation ou une teneur constante des polyphénols totaux des péricarpes.

Dans la grenade, la voie de biosynthèse des ellagitannins implique, comme dit précédemment, plusieurs enzymes, régulées par l'expression de plusieurs gènes et facteurs de transcription. Six gènes contrôlant l'expression de la shikimate déshydrogenase (SDH), la première enzyme spécifique à la synthèse des ellagitannins, ont été décrits dans la variété Taishanhong de Chine, ainsi que deux gènes pour l'expression de l'UDP-glycosyltransférase (UGT), et 34 gènes codant pour la phénol oxydase (nommée pentagalloylglucose oxygène oxydoréductase, POR) [319].

Habashi et al. [322] ont corrélé les teneurs en ellagitannins, anthocyanes et métabolites impliqués dans les voies de biosynthèse des polyphénols et l'expression de six SDHs dans la grenade. Cinq d'entre elles sont liées à la synthèse des tannins hydrolysables, et une seule à la production d'anthocyanes et autres polyphénols. La régulation de

l'expression des gènes codant pour ces SDHs est notamment contrôlée par des facteurs environnementaux, comme l'obscurité et le stress osmotique des cultures cellulaires. Plus précisément, l'obscurité et le stress osmotique engendrent une surexpression des SDHs de la voie des tannins hydrolysables, alors que les échantillons de grenade cultivés à la lumière sans stress osmotique présentent une surexpression de la SDH contrôlant la synthèse des anthocyanes. [322]. Il y aurait donc un lien direct entre la biosynthèse des ellagitannins et les stress environnementaux ainsi qu'une orientation vers la voie des anthocyanes et autres flavonoïdes dans certains cas.

A notre connaissance, aucune donnée n'est disponible sur la régulation des gènes codant pour ces enzymes dans la grenade et l'apport de minéraux. Cependant, des études à l'échelle transcriptomique de l'effet de l'apport foliaire de zinc sur d'autres végétaux ont montré une surexpression des facteurs de transcription et des enzymes impliqués dans la production des polyphénols, expliquant les teneurs plus élevées obtenues après le traitement [337–339]. La surexpression d'enzymes de réponse aux espèces réactives de l'oxygène (ROS) laisse supposer que l'apport de zinc entraînerait un stress oxydant qui pourrait être à l'origine de la synthèse des polyphénols [337]. De plus, le zinc augmenterait l'activité de deux enzymes clés de la voie de l'acide shikimique (shikimate déshydrogénase SDH, 3-Deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate synthase DAHPS) de *Brassica oleracea* et pourrait donc aussi intervenir comme co-facteur de ces enzymes et ainsi promouvoir la synthèse des polyphénols [339].

Les polyphénols et notamment ceux de la grenade [204] ont des propriétés de chélation d'ions métalliques, par conséquent leur production pourrait être un moyen pour les cellules de gérer et conserver le zinc. Les ions issus de l'application d'acide borique et de sulfate de zinc pourraient engendrer un stress oxydant conduisant à la production des polyphénols. Au vu de la complexité des voies de biosynthèse des polyphénols [340] et le manque de connaissances sur leur régulation dans la grenade, seules des hypothèses peuvent être émises sur les mécanismes expliquant les effets du zinc et du bore sur la teneur en polyphénols des péricarpes.

Les résultats montrent que le traitement appliqué peut entraîner une augmentation de la teneur en punicalagine en fonction du lieu de production et de la variété considérée. Beaucoup de facteurs entrent en compte dans l'efficacité d'un traitement foliaire : la formulation du traitement, les conditions environnementales de l'application du traitement, et les caractéristiques de la plante [341]. Dans notre étude, la formulation du traitement est identique pour toutes les parcelles et les deux variétés, par conséquent elle n'entre pas en compte dans nos résultats.

Les facteurs environnementaux incluent l'humidité relative, la température et la lumière lors de l'application. Dans notre étude, la température se situait entre 17 et 37 °C, l'humidité relative entre 52 et 92 %, et l'heure entre 8 h et 16 h pour les trois applications. Les trois facteurs environnementaux étaient donc variables pour toutes les localisations confondues, mais similaire sur chaque parcelle où Mollar de Elche et Provence sont cultivées. Sur les parcelles "Be" et "Du", les plus basses températures et les plus hauts taux d'humidité relative lors de l'application pourraient expliquer une meilleure absorption du traitement foliaire et par conséquent son effet. Les paramètres d'application du traitement (température, humidité relative ambiante) expliquent que pour Provence, le traitement foliaire à base de bore et zinc affecte les parcelles "Be"



et “Du” différemment de la parcelle “Co”. Ces paramètres étant similaires entre les deux variétés, ils n’expliquent pas que seule Provence soit affectée par le traitement.

Les caractéristiques de la plante influençant l’efficacité d’un traitement foliaire incluent la forme des feuilles, la composition chimique des feuilles et cuticules, la structure de la cire de surface, le stade phénologique, la mobilité du nutriment dans la plante, et la présence de stress abiotique (sécheresse, carence, température extrême, salinité) [341]. Par exemple, Liu et al. [342] ont mis en évidence une influence négative de la salinisation sur la surface foliaire, la teneur en eau et le taux de photosynthèse des feuilles. Des stress abiotiques présents sur les lieux de production, comme la salinité, pourraient expliquer que malgré des conditions d’application du traitement similaires sur les parcelles “Sa” et “Be”, le traitement n’affecte pas la teneur en punicalagine des péricarpes issus de “Sa”.

De plus, Drogoudi et al. [179] et Liu et al. [342] ont montré que selon la variété considérée, le taux photosynthétique, la surface foliaire, l’utilisation de l’eau intrinsèque et la conductance stomatale diffère parmi 4 et 18 variétés cultivées. Le traitement foliaire a été appliqué au même moment sur les vergers Provence et Mollar de Elche sur chaque parcelle et les conditions pédoclimatiques étaient donc similaires. La différence d’effet du traitement foliaire entre les deux variétés peut s’expliquer par des variations de leurs caractéristiques morphologiques et biochimiques propres, liées à un matériel génétique variable comme expliqué précédemment.

#### 3.3.1.b.iv. Conclusion

En résumé, parmi les trois parcelles où Provence et Mollar de Elche sont cultivées (“Co”, “Du”, “Sa”), les péricarpes de Provence montrent une teneur en punicalagine plus élevée que Mollar de Elche sur deux localisations. Le lieu de production influence la teneur en punicalagine des co-produits, et son effet diffère selon la variété considérée. Sur deux parcelles des six étudiées (“Sa” et “Du”), la teneur en punicalagine des péricarpes est minimale pour les deux variétés. Les teneurs en punicalagine les plus élevées sont retrouvées sur les parcelles “Re” et “Pu” pour Mollar de Elche, et “Be” et “Co” pour Provence. Le traitement foliaire contre l’éclatement à base de bore et de zinc affecte la teneur en punicalagine des péricarpes de grenades aussi selon la variété considérée. Pour la variété Provence, la teneur en punicalagine augmente après le traitement, alors qu’il n’y a pas d’effet sur la variété Mollar de Elche. L’influence du traitement foliaire engendre des variations dans les lots de co-produits présentant les teneurs les plus élevées issus des lieux de production ou entre les variétés.

La diversité génétique existant au sein des variétés de grenades affecterait donc à la fois la teneur en polyphénols des péricarpes et leur susceptibilité aux conditions environnementales et d’application d’un traitement foliaire. Cependant les connaissances actuelles sur la voie de biosynthèse des ellagitannins et sa régulation dans la grenade et les autres espèces produisant des ellagitannins ne permettent pas d’assurer avec certitude les phénomènes sous-jacents. Néanmoins nous avons montré que **la variété Provence cultivée dans le sud de la France contiendrait plus de polyphénols que la variété Mollar de Elche, et cette variété serait donc à cultiver en priorité dans l’optique d’une valorisation des polyphénols des péricarpes.**

Le lieu de production et les conditions pédoclimatiques liées seraient à l'origine des teneurs en polyphénols variables dans les péricarpes de grenades. Des recherches approfondies sur les mécanismes de réponse aux stress abiotiques du grenadier sont nécessaires pour conclure avec assurance sur leurs effets. Notre étude a mis en lumière des différences non négligeables de la teneur en polyphénols des péricarpes des variétés Mollar de Elche et Provence selon le lieu de culture.

Parmi les facteurs pouvant influencer la production de polyphénols, il semblerait que les températures durant le développement des fruits puissent expliquer, au moins partiellement, les variations entre les localisations. Les mécanismes biochimiques qui expliquent que le traitement foliaire puisse augmenter la teneur en punicalagine sont liés au rôle du bore et du zinc dans la plante qui n'est pas totalement élucidé. Dans notre cas les résultats montrent que Mollar de Elche semble moins sensible à l'application de bore et de zinc que Provence, mais aussi que les facteurs environnementaux sont impliqués dans l'effet réel du traitement foliaire. **Au vu de son absence d'effet ou son effet bénéfique, le traitement foliaire devrait être utilisé pour augmenter les teneurs en polyphénols totaux et punicalagine des péricarpes, et être appliqué dans des circonstances de température ambiante faible et humidité relative élevée.**

### **3.3.2. Influence des conditions de culture sur les lipides des co-produits de pressage des graines**

#### **3.3.2.a. Etude des marqueurs lipidiques expliquant la variabilité par analyse multivariée**

Les résultats de l'analyse en composantes principales effectuée avec les compositions des co-produits de pressage des graines de grenades sont donnés dans le tableau **3.10** et les figures **3.17**, **3.18**, **3.19**, et **3.20**. Les trois premières composantes expliquent au total 67,8 % de la variance entre les échantillons de co-produits, avec 33,9 %, 19,0 % et 14,9 % pour les composantes PC1, PC2 et PC3 respectivement. Environ deux tiers de la dispersion résultant de la composition chimique des co-produits est donc représentée, et un tiers n'est pas expliquée.

Les composantes PC1, PC2 et PC3 représentent fortement les acides saturés à plus de 16 carbones (acides palmitique C16:0, stéarique C18:0, arachidique C20:0, béhénique C22:0 et lignocérique C24:0) ainsi que les acides mono et poly-insaturés identifiés (acides oléique C18:1n-9, linoléique C18:2n-6, linolénique C18:3n-3, punique C18:3n-5,ctc, catalpique C18:3n-5,ttc,  $\beta$ -éléostéarique C18:3n-5,ttt et eicosénoïque C20:1n-9).

Les teneurs en huile et acide myristique (C14:0) ne sont pas bien représentées par ces trois composantes malgré des différences significatives entre les lots, ce qui suggère que l'information les concernant est présente dans les composantes suivantes et leur importance est moindre par rapport aux autres composés. La variabilité de la composition lipidique des échantillons de co-produits de pressage des graines réside donc principalement dans les teneurs relatives en acides gras saturés, mono- et poly-insaturés.

Les teneurs relatives en acide linoléique (C18:2n-6) et palmitique (C16:0) sont fortement significativement corrélées. Ces deux teneurs sont aussi corrélées avec des hautes teneurs en acides stéarique (C18:0), oléique (C18:1n-9), et arachidique (C20:0). Les échantillons contenant des teneurs relatives élevées de ces cinq acides gras présentent aussi des teneurs faibles en acide punicoïque (C18:3n-5,ctc) et eicosénoïque (C20:1n-9). Plus les teneurs en acide punicoïque et eicosénoïque sont hautes, plus les teneurs des cinq acides gras précédents sont faibles. Il semblerait donc que pour une même longueur de chaîne de carbone, les teneurs des acides gras à haut degré d'insaturation évoluent dans le sens opposé des acides gras plus saturés. Les isomères de l'acide punicoïque, l'acide catalpique (C18:3n-5,ttc) et l'acide  $\beta$ -éléostéarique (C18:3n-5,ttt), ont des teneurs relatives corrélées entre-elles sans interaction avec les autres teneurs en acides gras. De la même manière les teneurs en acides linoléénique (C18:3n-3), béhénique (C22:0) et lignocérique (C24:0) évoluent dans le même sens et ne sont pas associées aux teneurs des autres acides gras identifiés.

Quatre tendances se dessinent pour la caractérisation de la composition lipidique des co-produits de pressage des graines :

- (i) Les lots présentant des teneurs élevées en acides gras saturés (acides palmitique, stéarique et arachidique) et les acides gras à 18 carbones et une ou deux insaturations (acides oléique et linoléique) ;
- (ii) Les lots présentant des teneurs élevées en acide punicoïque et eicosénoïque ;
- (iii) Les lots présentant des teneurs élevées en isomères de l'acide punicoïque (acides catalpique et  $\beta$ -éléostéarique) ; et
- (iv) Les lots présentant des teneurs élevées en acide linoléénique, béhénique et lignocérique.

Tableau 3.10 : Variables et facteurs interprétables de l'analyse en composante principale de la composition des co-produits de pressage des graines de grenades. Les variables et facteurs interprétables sur chaque composante sélectionnée (PC1, PC2 et PC3) sont mis en évidence en gras.

Variable	Code variable	PC1 (33,9 %)	P (PC1)	PC2 (19,0 %)	P (PC2)	PC3 (14,9 %)	P (PC3)
<b>Variable</b>							
Rendement huile (g/g ms)	rdt_huile	-0,54	0,000	-0,25	0,064	-0,08	0,589
Acide myristique C14:0 (%)	c14_0	-0,29	0,033	-0,52	0,000	0,02	0,913
Acide palmitique C16:0 (%)	c16_0	<b>0,86</b>	<b>0,000</b>	-0,13	0,347	0,31	0,021
Acide stéarique C18:0 (%)	c18_0	<b>0,65</b>	<b>0,000</b>	-0,23	0,089	-0,42	0,001
Acide oléique C18:1n-9 c (%)	c18_1n_9	<b>0,74</b>	<b>0,000</b>	0,19	0,165	-0,39	0,004
Acide linoléique C18:2n-6 c (%)	c18_2n_6	<b>0,81</b>	<b>0,000</b>	-0,12	0,388	0,29	0,032
Acide $\alpha$ -linoléique C18:3n-3 c (%)	c18_3n_3_a	-0,08	0,543	<b>0,79</b>	<b>0,000</b>	0,29	0,034
Acide punicoïque C18:3n-5 c,t,c (%)	c18_3n_5_ctc	<b>-0,95</b>	<b>0,000</b>	0,03	0,806	-0,13	0,366
Acide catalpique C18:3n-5 t,t,c (%)	c18_3n_5_ttc	-0,12	0,368	-0,25	0,069	<b>0,71</b>	<b>0,000</b>
Acide $\beta$ -éléostéarique C18:3n-5 t,t,t (%)	c18_3n_5_ttt	0,00	0,999	-0,01	0,956	<b>0,88</b>	<b>0,000</b>
Acide arachidique C20:0 (%)	c20_0	<b>0,65</b>	<b>0,000</b>	-0,64	0,000	0,17	0,227
Acide eicosénoïque C20:1n-9 c (%)	c20_1n_9	<b>-0,76</b>	<b>0,000</b>	-0,11	0,416	0,14	0,309
Acide béhénique C22:0 (%)	c22_0	0,21	0,133	<b>0,80</b>	<b>0,000</b>	0,31	0,021
Acide lignocérique C24:0 (%)	c24_0	0,24	0,076	<b>0,66</b>	<b>0,000</b>	-0,20	0,157
<b>Facteur étudié</b>							
Lot de co-produit			<b>0,000</b>		<b>0,000</b>		<b>0,000</b>
Localisation			<b>0,000</b>		<b>0,001</b>		0,195
Variété			0,118		<b>0,003</b>		<b>0,000</b>
Traitement			0,806		0,295		0,237
Réplikat échantillon			0,994		0,463		0,808

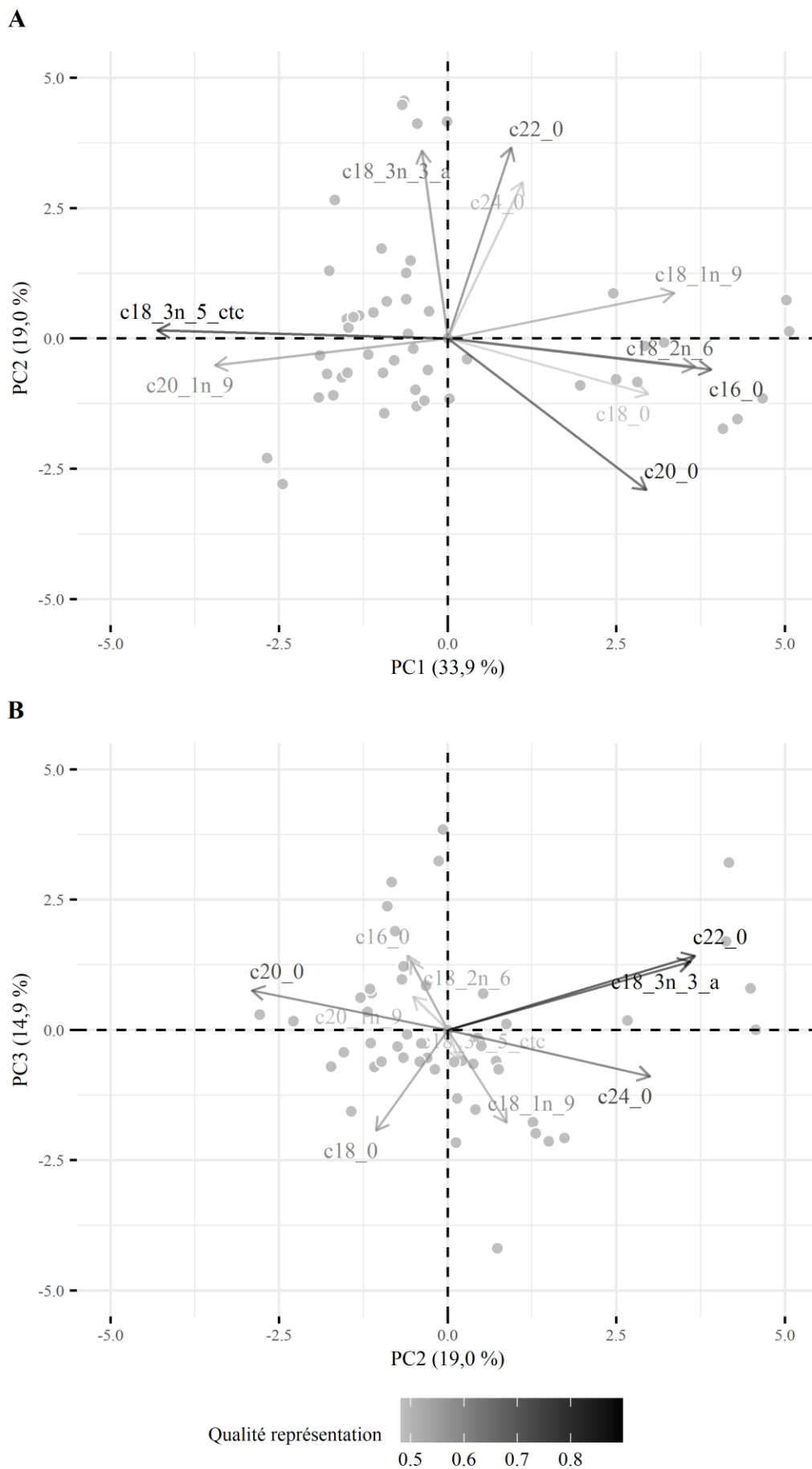


Figure 3.17 : Liaisons entre le rendement en huile et les teneurs en acides gras des co-produits de pressage des graines. Représentation sur les plans formés par les composantes PC1,PC2 (A) et PC2,PC3 (B) des individus (18 échantillons, 3 répétitions) et de leurs variables (composés). La qualité de la représentation des composés (vecteurs) sur les plans est donnée par un indice croissant de gris à noir. Seuls les composés corrélés fortement et significativement par les composantes sont représentés ( $|R|>0,7$ ,  $p<0,05$ ). Les noms des composés associés aux codes sont donnés dans le tableau 3.10.

Les échantillons se distinguent entre-eux principalement par la localisation des parcelles et dans une moindre mesure par la variété. Le traitement foliaire ne semble pas entraîner de différence des teneurs en acides gras expliquant le plus la variabilité.

Les échantillons représentés par parcelle (figure **3.18**) diffèrent sur trois des quatre tendances de composition décrites précédemment. Plus de la moitié de la dispersion entre les compositions lipidiques des échantillons est liée à la localisation des parcelles. Trois groupes de parcelles peuvent être formés à partir de leur composition.

Le premier correspond à la localisation “Sa” qui est très distincte des autres. Les teneurs maximales en acides palmitique (c16\_0, 3,2 %), stéarique (c18\_0, 2,2 %), oléique (c18\_1n\_9, 5,4 %), linoléique (c18\_2n\_6, 6,3 %) et arachidique (c20\_0, 0,5 %) sont retrouvées dans ces échantillons, ainsi que les teneurs minimales en acide punicique (c18\_3n\_5\_ctc, 80,4 %) et eicosénoïque (c20\_1n\_9, 0,3 %).

Le second groupe correspond aux parcelles “Co”, “Pu”, “Re” dans lesquelles les teneurs varient dans le sens inverse : les teneurs les plus élevées en acide punicique (82,4-83,6 %) et eicosénoïque (0,4 %) et les teneurs les plus faibles des acides gras moins insaturés correspondant sont retrouvées.

Le dernier groupe peut être formé par les parcelles “Be” et “Du”. Les co-produits de pressage des graines issus de ces parcelles contiennent, comme pour le second groupe, des hautes teneurs en acides punicique (82,7-82,8 %) et eicosénoïque (0,4 %) et des teneurs minimales en acides palmitique, stéarique, oléique, linoléique et arachidique, mais aussi des teneurs élevées en acides béhénique (0,1-0,2 %), ainsi que la présence d'acides linoléique et lignocérique (<0,1 %).

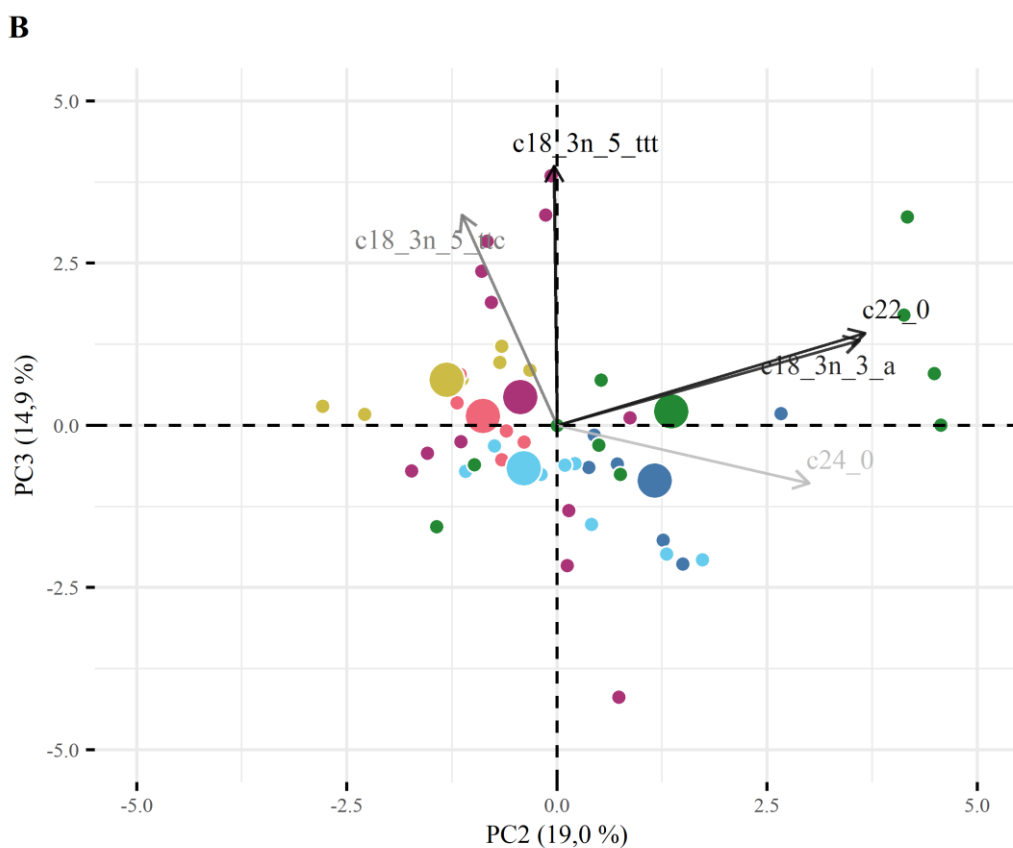
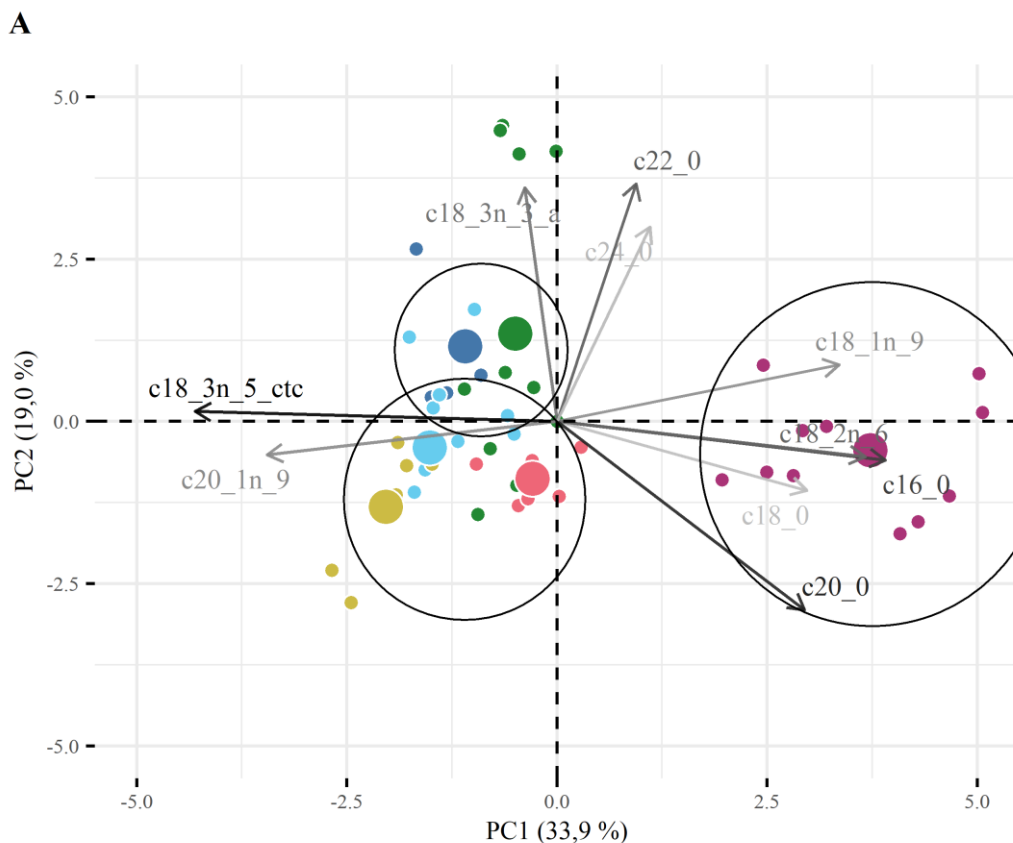


Figure 3.18 : Effet de la localisation des parcelles sur le rendement en huile et les teneurs en acides gras des co-produits de pressage des graines. Représentation sur les plans formés par les composantes PC1,PC2 (A) et PC2,PC3 (B) des individus et leurs barycentres (points), et de leurs variables (composés). La qualité de la représentation des composés (vecteurs) sur les plans est donnée par un indice croissant de gris à noir, et les parcelles sont représentées en couleur (bleu, cyan, vert, jaune, rose et magenta pour Be, Co, Du, Pu, Re et Sa, respectivement,  $n=6$  pour chaque parcelle). Seuls les composés corrélés fortement et significativement par les composantes sont représentés ( $|R|>0,7$ ,  $p<0,05$ ). Les noms des composés associés aux codes sont donnés dans le tableau 3.10.

Les variétés Mollar de Elche et Provence se différencient par leurs teneurs en acides catalpique (c18\_3n\_5\_ttc) et  $\beta$ -éléostéarique (c18\_3n\_5\_ttt) (figure 3.19).

La variété Mollar de Elche semble contenir plus de ces acides gras, avec des teneurs moyennes de 0,9 et 0,7 % pour les acides catalpique et  $\beta$ -éléostéarique respectivement, alors que les co-produits issus de la variété Provence ont des teneurs respectives de 0,8 et 0,6 % en moyenne sur toutes les localisations.

Les différences entre les échantillons ne sont pas expliquées par le traitement foliaire (figure 3.20). En effet, les teneurs en acides linoléique, punicoïque,  $\beta$ -éléostéarique et linoléique qui représentent chacune des tendances décrites précédemment sont en moyenne de 5,3, 82,5, 0,7, <0,1 et 5,3, 82,4, 0,7, <0,1 % pour les lots non traités et traités respectivement. Ces valeurs sont sensiblement équivalentes, par conséquent le traitement foliaire ne semble donc pas affecter la composition chimique des co-produits de pressage des graines.



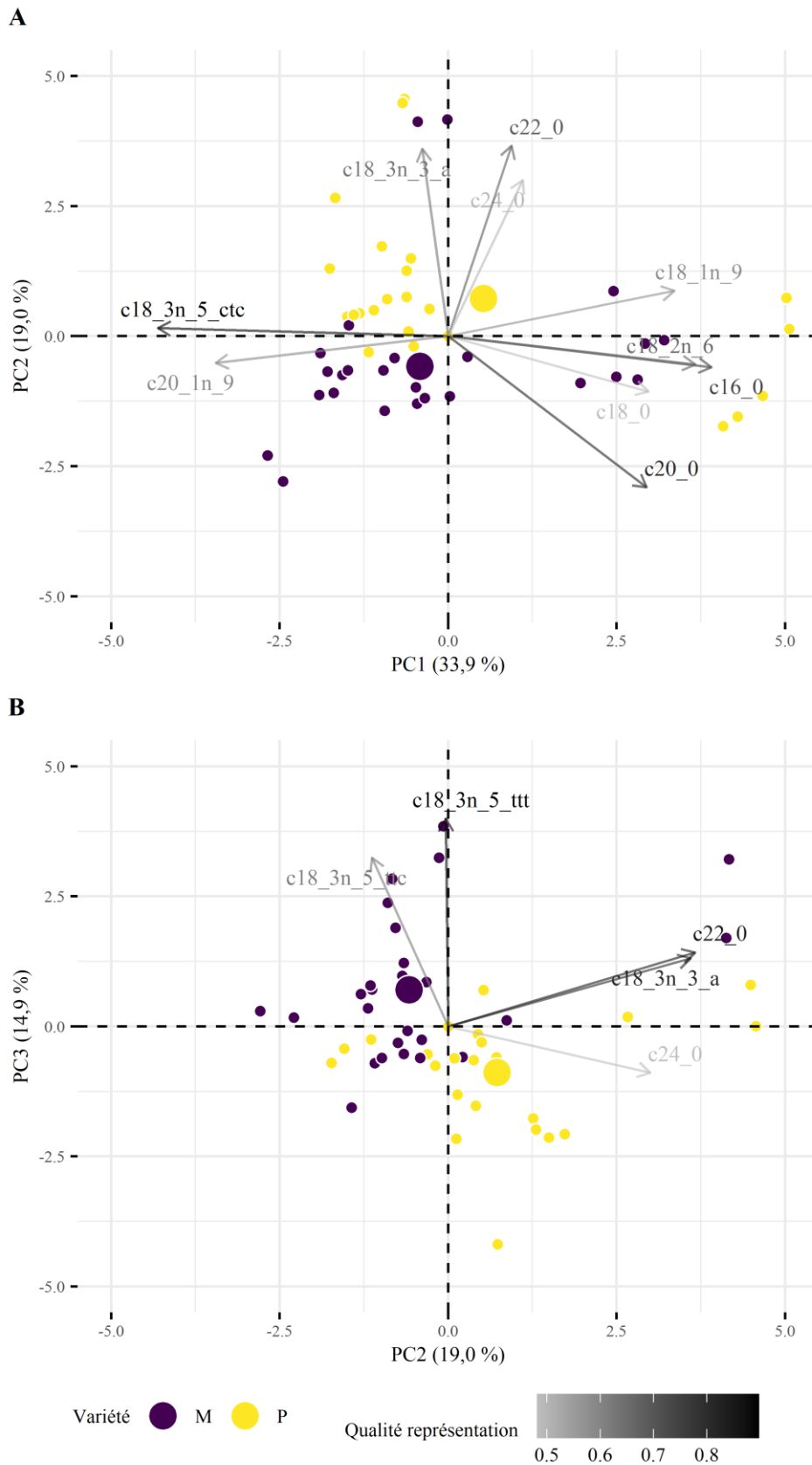


Figure 3.19 : Effet de la variété de grenade sur le rendement en huile et les teneurs en acides gras des co-produits de pressage des graines. Représentation sur les plans formés par les composantes PC1,PC2 (A) et PC2,PC3 (B) des individus et leurs barycentres (points), et de leurs variables (composés). La qualité de la représentation des composés (vecteurs) sur les plans est donnée par un indice croissant de gris à noir, et les variétés sont représentées en jaune (Provence, n=24) et violet (Mollar de Elche, n=30). Seuls les composés corrélés fortement et significativement par les composantes sont représentés ( $|R|>0,7$ ,  $p<0,05$ ). Les noms des composés associés aux codes sont donnés dans le tableau 3.10.

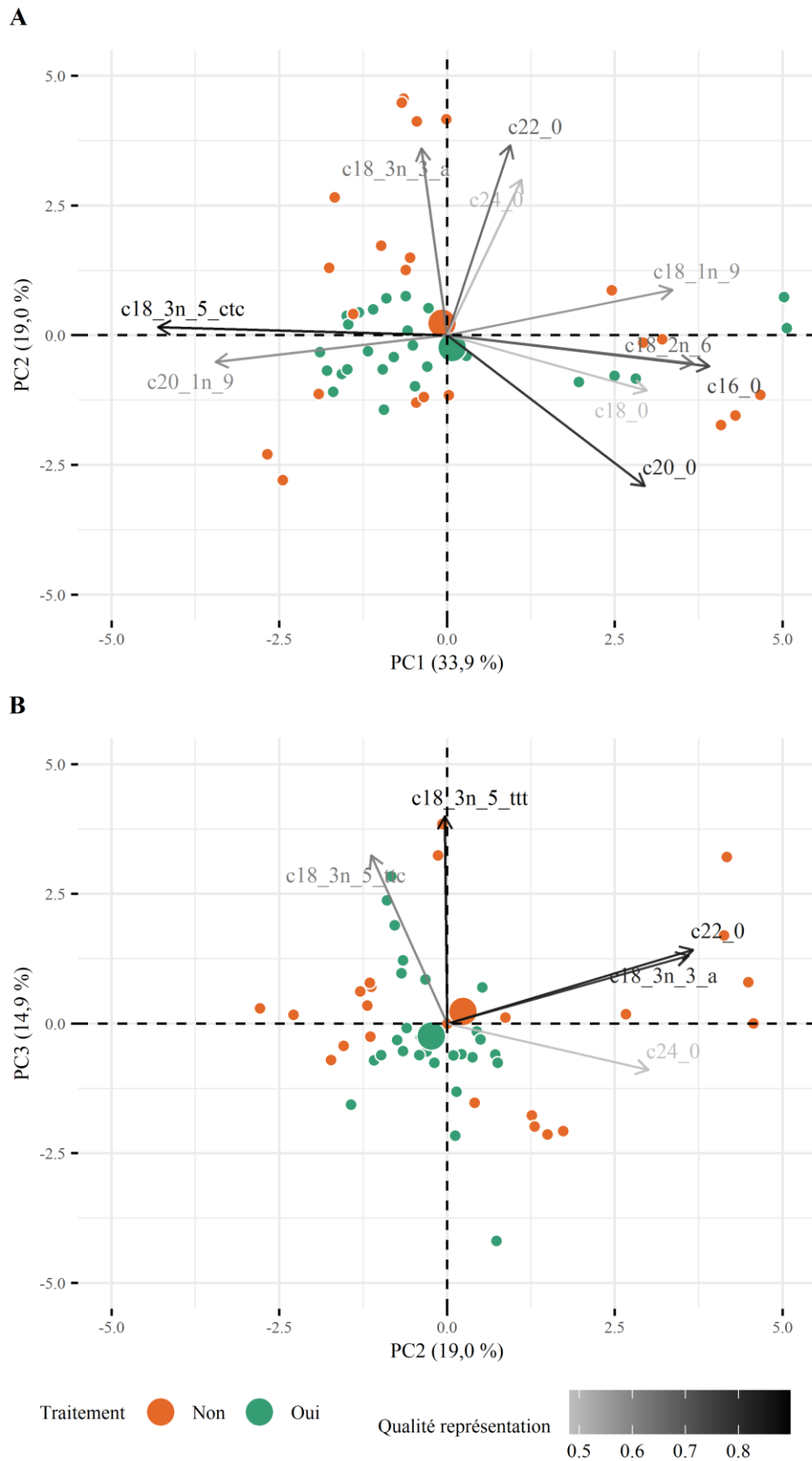


Figure 3.20 : Effet du traitement foliaire sur le rendement en huile et les teneurs en acides gras des co-produits de pressage des graines. Représentation sur les plans formés par les composantes PC1,PC2 (A) et PC2,PC3 (B) des individus et leurs barycentres (points), et de leurs variables (composés). La qualité de la représentation des composés (vecteurs) sur les plans est donnée par un indice croissant de gris à noir, et les variétés sont représentées en orange (non traité, n=27) et turquoise (traité, n=27). Seuls les composés corrélés fortement et significativement par les composantes sont représentés ( $|R|>0,7$ ,  $p<0,05$ ). Les noms des composés associés aux codes sont donnés dans le tableau 3.10.

D'après les résultats, la variété de grenade semble influencer principalement les teneurs en acide catalpique et  $\beta$ -éléostéarique, et Mollar de Elche présente des teneurs supérieures à Provence de 0,1 % ce qui semble relativement négligeable bien que significatif. De nombreuses études ont mis en évidence des similarités et différences de teneur en huile et de profil d'acides gras entre certaines variétés de grenades cultivées en Inde [188], Italie [55], Espagne [184], et Iran [185].

Le lieu de production des grenades aurait une plus grande influence sur la composition lipidique des co-produits de pressage des graines que la variété. Trois groupes de localisations peuvent être formés : teneurs maximales en acides palmitique, stéarique et C18 et C20 à une et deux insaturations (parcelle "Sa") ; teneurs maximales en acides linoléique, punicique, eicosénoïque, béhénique et lignocérique (parcelles "Be" et "Du") ; teneurs maximales en acides eicosénoïque et punicique (parcelles "Co", "Pu" et "Re"). Deux études ont porté sur les variations des teneurs en huile et acide gras des graines de grenades ou de la partie interne des graines de grenades (co-produit de pressage sans les parties restantes d'arille). Elfalleh et al. [186] ont conclu après la comparaison de 21 variétés de grenades cultivées en Tunisie et en Chine que la localisation semble avoir une influence supérieure à la variété sur les teneurs en huile et en acides gras. Loukhamas et al. [202] ont évalué l'influence de six lieux de production sur la composition lipidique de la variété Sefri. Deux localisations entraînent des rendements en huile significativement différents de deux autres localisations, et les deux dernières ont des rendements similaires aux quatre autres. En ce qui concerne les acides gras, le majoritaire est l'acide punicique qui ne varie pas significativement entre les localisations (78,7-80,7 %), alors que des variations sont retrouvées entre certains lieux de production pour ses isomères et les acides gras moins insaturés correspondant.

Le traitement foliaire au bore et zinc ne semble pas expliquer les différences principales entre les échantillons de co-produits de pressage des graines de l'étude. Maity et al. [188] ont aussi évalué l'effet d'un tel traitement sur la teneur en huile des graines de grenades, et ont mis en évidence une augmentation du rendement de 1 à 2 % pour deux variétés et un rendement similaire pour la troisième. Safa et al. [203] se sont intéressés à l'effet de l'application foliaire de zinc uniquement, et n'ont pas détecté de changement ni sur la teneur en huile, ni sur le profil d'acides gras des graines. Nos résultats sont en accord avec la littérature en ce qui concerne l'influence de la variété, de la localisation et du traitement sur la composition des co-produits de pressage des graines de grenades. Cependant, les interactions possibles entre ces différents facteurs n'ont pas encore été étudiées à notre connaissance et seront donc développées dans la partie suivante en s'appuyant sur les teneurs en acides punicique et  $\beta$ -éléostéarique. **L'acide punicique** représente l'acide gras majoritaire des co-produits, et sa proportion est corrélée positivement et négativement à plusieurs autres acides gras. De l'évolution de sa teneur peuvent être déduites les teneurs en acides eicosénoïque, palmitique, stéarique, oléique, linoléique, et arachidique. **La teneur en acide  $\beta$ -éléostéarique** permet de déduire celle de son isomère, l'acide catalpique, et la teneur en acide linoléique celle des acides béhénique et lignocérique.

### 3.3.2.b. Influence des conditions de culture sur la composition en acides punicique et $\beta$ -éléostéarique

Les effets de la variété de grenade, des conditions pédoclimatiques et du traitement foliaire sur les composés sélectionnés, les acides punicique et  $\beta$ -éléostéarique, ont été évalués par analyse de la variance (ANOVA). Les tableaux 3.11 et 3.12 résument, pour chaque teneur, ces trois effets.

Tableau 3.11 : Résumé des effets des conditions de culture sur la teneur en acide punicique des co-produits de pressage. E. : Elche.

Parcelles						
Lot de matière	Be	Co	Du	Pu	Re	Sa
<b>Effet variété</b>						
Non traité	na	ns	ns	na	na	ns
Traité	na	ns	Mollar de E.	na	na	Mollar de E.
<b>Effet conditions pédo-climatiques</b>						
Mollar de E.	na	teneur élevée	teneur élevée	teneur élevée	teneur moyenne	teneur faible
Provence	teneur moyenne	teneur élevée	teneur moyenne	na	na	teneur faible
<b>Effet traitement</b>						
Mollar de E.	na	aucun effet	aucun effet	aucun effet	aucun effet	aucun effet
Provence	diminution teneur	diminution teneur	diminution teneur	na	na	diminution teneur

Tableau 3.12 : Résumé des effets des conditions de culture sur la teneur en acide  $\beta$ -éléostéarique des co-produits de pressage. E. : Elche.

Parcelles						
Lot de matière	Be	Co	Du	Pu	Re	Sa
<b>Effet variété</b>						
Non traité	na	Mollar de E.	Mollar de E.	na	na	Mollar de E.
Traité	na	Mollar de E.	Mollar de E.	na	na	Mollar de E.
<b>Effet conditions pédo-climatiques</b>						
Mollar de E. non traité	na	teneur moyenne	teneur élevée	teneur moyenne	teneur faible	teneur moyenne
Mollar de E. traité	na	teneur faible	teneur moyenne	teneur moyenne	teneur faible	teneur élevée
Provence	teneur moyenne	teneur moyenne	teneur moyenne	na	na	teneur moyenne
<b>Effet traitement</b>						
Mollar de E.	na	aucun effet	diminution teneur	aucun effet	aucun effet	aucun effet
Provence	aucun effet	aucun effet	aucun effet	na	na	aucun effet

### 3.3.2.b.i. Teneur en acide punicique

Les effets des conditions de culture sur les teneurs en acide punicique des lots de co-produits de pressage des graines sont présentés sur les figures 3.21, 3.22 et 3.23. L'analyse de la variance met en évidence l'absence d'interaction significative entre la variété, la parcelle et le traitement (ANOVA, 3 facteurs "variété", "lieu de production", "traitement", seuil de significativité 5 %,  $p > 0,05$ ). Toutefois, l'effet de la variété dépend du traitement ( $p < 0,01$ ) et de la localisation de la parcelle ( $p < 0,001$ ), par conséquent il a été évalué par lieu de production en séparant les lots traités et non traités. En revanche, l'effet du lieu de production varie selon la variété ( $p < 0,001$ ), mais il est indépendant du traitement appliqué ( $p > 0,05$ ) et a donc été décrit par variété. Inversement, l'effet du traitement foliaire dépend de la variété ( $p < 0,01$ ), mais n'est pas lié au lieu de production ( $p > 0,05$ ), et a donc aussi été décrit pour Mollar de Elche et Provence séparément.

- **Effet variété**

L'effet de la variété de grenade sur la teneur en acide punicique des co-produits de pressage a été apprécié sur les parcelles sur lesquelles les variétés Mollar de Elche et Provence ont été cultivées conjointement, "Co", "Du" et "Sa" (figure 3.21).

Pour les lots non traités, la variété n'affecte pas significativement la teneur en acide punicique ( $p > 0,05$ ). La teneur en acide punicique de Mollar de Elche et Provence peut donc être estimée en moyenne à 83,6, 82,7 et 80,5 % sur les parcelles "Co", "Du" et "Sa", respectivement.

Pour les lots de co-produits issus des grenadiers traités, la variété affecte significativement la teneur en acide punicique des parcelles "Du" ( $p < 0,01$ ) et "Sa" ( $p < 0,001$ ). Sur ces parcelles, les co-produits de pressage de Mollar de Elche contiennent 83,2 et 81,0 % d'acide punicique et Provence 82,2 et 79,7 %, respectivement. Néanmoins, ces augmentations de 1 et 0,3 % entre Provence et Mollar de Elche semblent faibles. Les teneurs relatives en acide punicique entre les deux variétés cultivées sur la parcelle "Co" ne sont pas significativement différentes ( $p > 0,05$ ) et peuvent être estimées en moyenne à 83,6 %.

La teneur relative en acide punicique des variétés Mollar de Elche et Provence est similaire pour les lots issus des grenadiers non traités sur les trois parcelles étudiées "Co", "Sa" et "Du", et les lots issus des grenadiers traités sur la parcelle "Co". Celle de la variété Mollar de Elche traitée est légèrement plus élevée que Provence pour les lots des parcelles "Sa" et "Du", mais les écarts de 1 % ou moins paraissent négligeables.

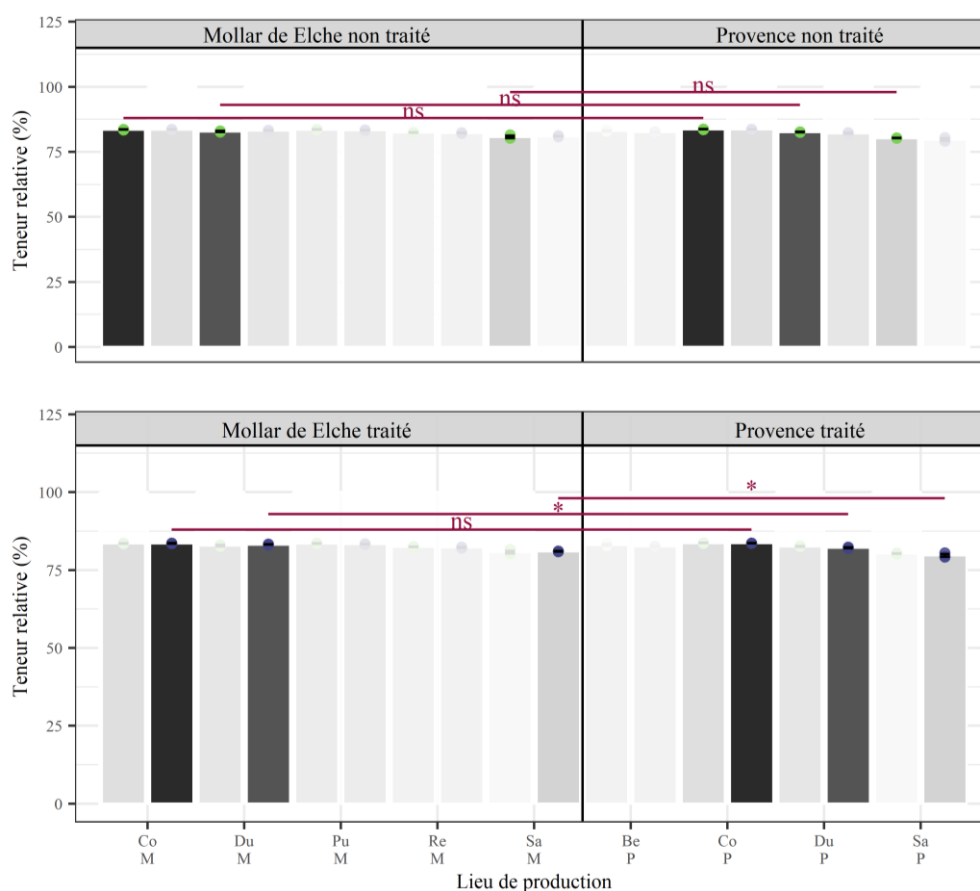


Figure 3.21 : Effet de la variété sur la teneur en acide punicoïque des co-produits de pressage des graines de grenades. La teneur en acide punicoïque (%) des échantillons est représentée par des points vert (lots non traités,  $n=3$ ) ou violet (lots traités,  $n=3$ ) par variété. Les moyennes (barres) sont colorées de gris foncé à gris clair pour, dans l'ordre, les parcelles "Be", "Co", "Du", "Pu", "Re", "Sa". Les teneurs en acide punicoïque des co-produits de pressage des lots ne pouvant être comparés sont grisées. La significativité est représentée par les symboles "ns" : non significatif, "\*" : significatif  $p<0,05$ , "\*\*" : significatif  $p<0,01$ , "\*\*\*" : significatif  $p<0,001$ , "\*\*\*\*" : significatif  $p<0,0001$ .

### • Effet des conditions pédoclimatiques

L'effet du lieu de production (figure 3.22) a été évalué pour les deux variétés séparément, en raison de leurs teneurs en acide punicoïque différentes, et il est significatif pour Mollar de Elche et Provence ( $p<0,0001$ ).

Pour la variété Mollar de Elche, les co-produits issus des localisations (Co,Re), (Co,Sa), (Du,Re), (Du,Sa), (Pu,Re), (Pu,Sa) et (Re,Sa) contiennent des teneurs en acide punicoïque significativement différentes ( $p<0,05$ ), alors que les localisations (Co,Du), (Co, Pu), (Du,Pu) ont des teneurs similaires ( $p>0,05$ ). Les différences significatives entre les localisations se situent entre 0,7 et 2,7 % d'acide punicoïque, avec des teneurs relatives comprises entre 80,9 et 83,6 %. Les localisations "Co", "Du" et "Pu" ont une teneur en acide punicoïque élevée (en moyenne 83,4 %), puis "Re" une teneur moyenne avec 82,4 % et enfin "Sa" avec la teneur minimale de 80,9 %.

Pour la variété Provence, les co-produits de pressage des graines obtenus des localisations (Be,Co), (Be,Sa), (Co,Du), (Co,Sa), (Du,Sa) ont des teneurs relatives en

acide punicoïque significativement différentes ( $p < 0,05$ ), alors que les co-produits issus des localisations (Be, Du) ont des teneurs similaires ( $p > 0,05$ ). Les variations de la teneur en acide punicoïque engendrées par la parcelle sont comprises entre 0,8 et 3,6 % pour des teneurs entre 80,9 et 83,6 %. La localisation “Co” produit les co-produits de pressage des graines de grenades avec la teneur en acide punicoïque la plus élevée (83,6 %), suivie par les localisations “Be” et “Du” avec une teneur moyenne de 82,6 %, puis “Sa” avec la teneur minimale de 80,0 %.

Pour les deux variétés, la localisation “Sa” semble produire les co-produits de pressage avec la teneur la plus faible en acide punicoïque (80,9 et 80,0 % pour Mollar de Elche et Provence, respectivement), alors que les co-produits issus de la parcelle “Co” contiennent des teneurs élevées (83,6 et 83,7 % pour Mollar de Elche et Provence respectivement).

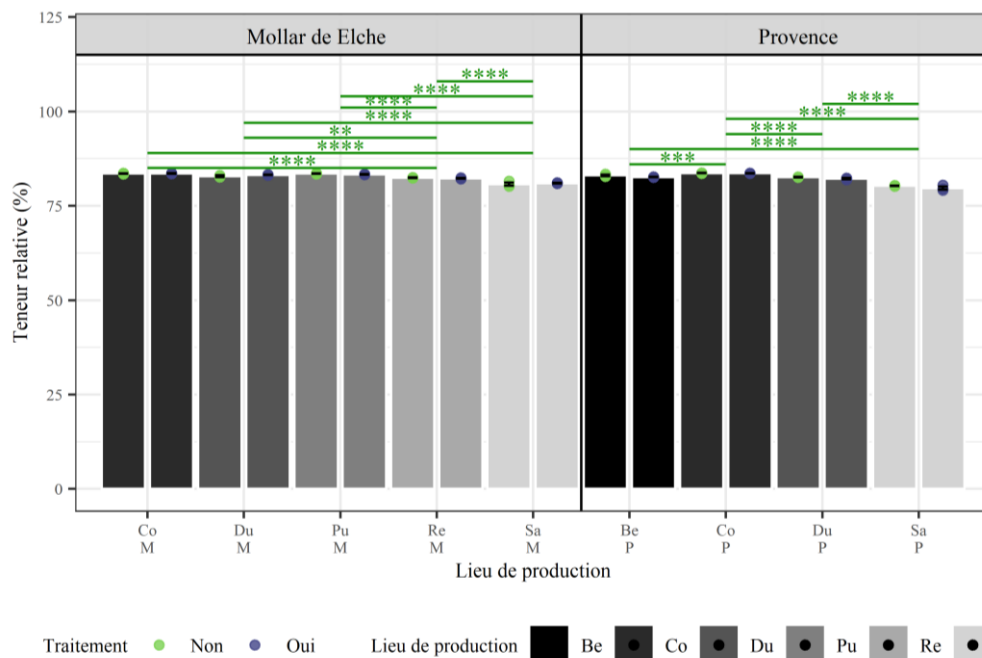


Figure 3.22 : Effet des conditions pédoclimatiques sur la teneur en acide punicoïque des co-produits de pressage des graines de grenades. La teneur en acide punicoïque (%) des échantillons est représentée en vert (lots non traités,  $n=3$ ) ou violet (lots traités,  $n=3$ ) par variété. Les moyennes (barres) sont colorées de gris foncé à gris clair pour chaque parcelle. La significativité est représentée par les symboles “ns” : non significatif, “\*” : significatif  $p < 0,05$ , “\*\*” : significatif  $p < 0,01$ , “\*\*\*” : significatif  $p < 0,001$ , “\*\*\*\*” : significatif  $p < 0,0001$ .

### • Effet du traitement

L’effet du traitement sur la teneur relative en acide punicoïque des co-produits de pressage des graines a été évalué par variété (figure 3.23), car il dépend de celle-ci ( $p < 0,05$ ) tout en étant indépendant du lieu de production ( $p > 0,05$ ). Le traitement n’influence pas significativement la teneur en acide punicoïque des co-produits issus de la variété Mollar de Elche ( $p > 0,05$ ) alors qu’il affecte significativement celle de la variété Provence ( $p < 0,01$ ). La teneur relative en acide punicoïque des co-produits de la variété Provence diminue de 0,1 à 0,6 % sur les différentes parcelles.

Par conséquent, le traitement foliaire ne semble pas affecter la teneur en acide punicique de la variété Mollar de Elche alors que celle de la variété Provence diminue de moins de 1 %, ce qui semble négligeable.

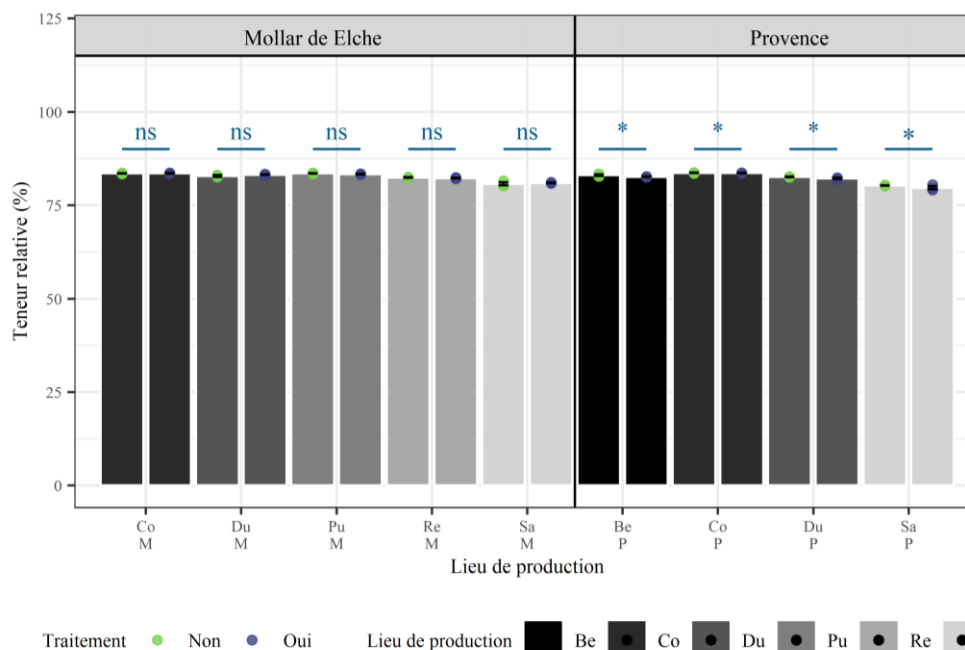


Figure 3.23 : Effet du traitement foliaire sur la teneur en acide punicique des co-produits de pressage des graines de grenades. La teneur en acide punicique (%) des échantillons est représentée en vert (lots non traités,  $n=3$ ) ou violet (lots traités,  $n=3$ ) par variété. Les moyennes (barres) sont colorées de gris foncé à gris clair pour chaque parcelle. La significativité est représentée par les symboles “ns” : non significatif, “\*” : significatif  $p<0,05$ , “\*\*” : significatif  $p<0,01$ , “\*\*\*” : significatif  $p<0,001$ , “\*\*\*\*” : significatif  $p<0,0001$ .

Cette étude a donc montré que la variété n’a pas d’effet sur la teneur en acide punicique des co-produits de pressage des graines, qui peut être estimée à 82,5 % en moyenne. La localisation des parcelles entraîne une variation de la teneur en acide punicique, indépendante du traitement mais dépendante de la variété considérée. Des similitudes entre les deux variétés se dégagent tout de même car les co-produits de pressage obtenus de la parcelle “Co” contiennent des teneurs relatives parmi les plus hautes (83,6 % pour Mollar de Elche et Provence respectivement), et ceux obtenus de la parcelle “Sa” les teneurs les plus faibles (80,9 et 80,0 % respectivement). Le traitement foliaire à base de bore et de zinc influence la teneur en acide punicique selon la variété considérée mais indépendamment de la localisation. L’application du traitement foliaire sur les grenadiers Provence diminue la teneur en acide punicique de 0,1 à 0,6 %, et ne change pas cette teneur pour les co-produits issus de Mollar de Elche. L’effet du traitement explique que lors de la comparaison des variétés, malgré des teneurs similaires sans traitement, les lots traités de Provence aient des teneurs inférieures à ceux de Mollar de Elche. Les variations des teneurs en acide punicique des co-produits de pressage des graines de grenades engendrées par le lieu de production et le traitement foliaire sont inférieures à 5 %.

D’après les corrélations entre les composés décrites précédemment, la teneur en acide eicosénoïque devrait suivre la même tendance que celle de l’acide punicique. En effet, les variétés Mollar de Elche et Provence ont des teneurs similaires, en moyenne 0,40



et 0,38 %, les localisations “Co” et “Sa” ont des teneurs légèrement différentes, en moyenne 0,41, 0,37 et 0,37, 0,32 % pour Mollar de Elche et Provence respectivement, mais le traitement foliaire ne semble pas affecter cette teneur (0,40 et 0,40 % pour Mollar de Elche non traitée et traitée, 0,38 et 0,39 % pour Provence non traitée et traitée).

**3.3.2.b.ii. Teneur en acide β-éléostéarique**

• **Effet de la variété**

L’effet de la variété de grenade (figure 3.24) sur la teneur en acide β-éléostéarique est indépendant de la localisation et du traitement appliqué (ANOVA 3 facteurs “variété” “localisation” “traitement”,  $p > 0,05$ ) pour les lots de co-produits de pressage issus des parcelles sur lesquelles les deux variétés sont cultivées (“Co”, “Du”, “Sa”). Sur ces trois parcelles, la variété a un effet significatif sur la teneur en acide β-éléostéarique ( $p < 0,001$ ). En moyenne, la teneur relative des co-produits Mollar de Elche est de 0,7 % et celle des co-produits Provence de 0,6 %. La variété Mollar de Elche contient donc 0,1 % d’acide β-éléostéarique de plus que Provence, ce qui paraît négligeable.

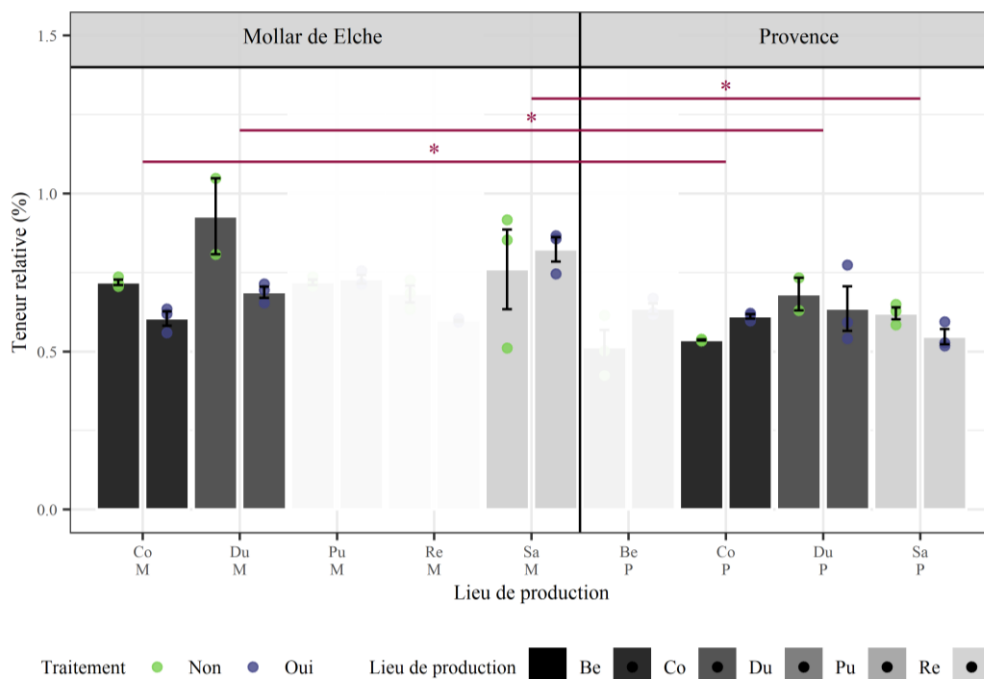


Figure 3.24 : Effet de la variété sur la teneur en acide β-éléostéarique des co-produits de pressage des graines de grenades. La teneur en acide β-éléostéarique (%) est représentée en vert (lots non traités, n=3) ou violet (lots traités, n=3) par variété. Les moyennes (barres) sont colorées de gris foncé à gris clair pour chaque parcelle. Les teneurs en acide β-éléostéarique des lots ne pouvant être comparés sont grisées. La significativité est représentée par les symboles “ns” : non significatif, “\*” : significatif  $p < 0,05$ , “\*\*” : significatif  $p < 0,01$ , “\*\*\*” : significatif  $p < 0,001$ , “\*\*\*\*” : significatif  $p < 0,0001$ .

• **Effet des conditions pédoclimatiques**

L’effet du lieu de production dépend à la fois de la variété et du traitement ( $p < 0,05$ ), donc a été évalué séparément pour chaque lot issu de variété ou de traitement différents (figure 3.25). Pour la variété Mollar, le lieu de production a un effet lié au traitement

( $p < 0,05$ ), alors que pour la variété Provence, il n'affecte pas la teneur relative en acide  $\beta$ -éléostéarique ( $p > 0,05$ ).

Les teneurs en acide  $\beta$ -éléostéarique de la variété Mollar de Elche non traitée des localisations (Du,Re) sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) avec une différence moyenne de 0,3 %, et elles sont similaires sur les autres parcelles ( $p > 0,05$ ). Les lots traités montrent des teneurs significativement différentes entre les parcelles (Co,Sa) et (Re,Sa) avec des variations moyennes de 0,2 % ( $p < 0,05$ ).

Par conséquent, pour les lots non traités, les co-produits de la parcelle "Du" contiennent une teneur relative plus élevée que "Re", et pour les lots traités, les co-produits de la parcelle "Sa" montrent une teneur plus élevée que "Co" et "Re". La teneur la plus faible est donc retrouvée dans les co-produits de la parcelle "Re".

La teneur en acide  $\beta$ -éléostéarique de la variété Mollar de Elche évolue entre les parcelles avec des tendances différentes générées par l'application du traitement foliaire. Les écarts de moins de 1 % semblent donc négligeables mais cohérents avec la faible teneur de cet acide gras. Les co-produits de pressage de la variété Provence présentent des teneurs en acide  $\beta$ -éléostéarique similaires entre les quatre parcelles étudiées "Be", "Co", "Du" et "Sa", qui peuvent être estimées à 0,6 %.

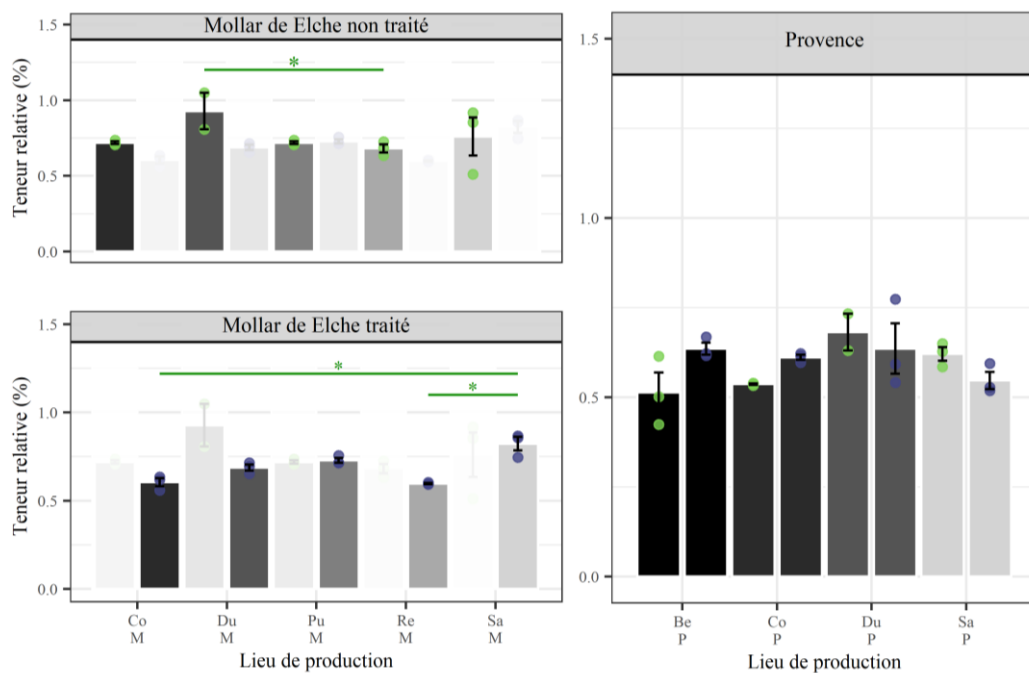


Figure 3.25 : Effet des conditions pédoclimatiques sur la teneur en acide  $\beta$ -éléostéarique des co-produits de pressage des graines de grenades. La teneur en acide  $\beta$ -éléostéarique (%) est représentée en vert (lots non traités,  $n=3$ ) ou violet (lots traités,  $n=3$ ) par variété. Les moyennes (barres) sont colorées de gris foncé à gris clair pour chaque parcelle. Les teneurs des lots ne pouvant être comparés sont grisées. La significativité est représentée par les symboles "ns" : non significatif, "\*" : significatif  $p < 0,05$ , "\*\*" : significatif  $p < 0,01$ , "\*\*\*" : significatif  $p < 0,001$ , "\*\*\*\*" : significatif  $p < 0,0001$ .

#### • Effet du traitement

Finalement, l'effet du traitement foliaire sur la teneur en acide  $\beta$ -éléostéarique a été évalué pour Mollar de Elche et Provence séparément.

Pour Provence, le traitement n'influence pas cette teneur ( $p > 0,05$ ), avec 0,6 % d'acide  $\beta$ -éléostéarique en moyenne. Pour Mollar de Elche, l'effet du traitement dépend de la parcelle ( $p < 0,05$ ). Sur la parcelle "Du", l'application du traitement diminue significativement ( $p < 0,01$ ) la teneur en acide  $\beta$ -éléostéarique de 0,9 à 0,7 %, alors que les autres parcelles ne sont pas affectées ( $p > 0,05$ ). Le traitement foliaire diminue donc la teneur relative en acide  $\beta$ -éléostéarique des co-produits de pressage de 0,2 % de la variété Mollar sur la parcelle "Du", mais n'affecte pas cette teneur pour la variété Mollar de Elche des quatre autres parcelles qui se situe en moyenne à 0,7 %, 0,7 %, 0,7 %, et 0,8 % pour "Co", "Pu", "Re", "Sa", respectivement. Les teneurs en acide  $\beta$ -éléostéarique sont aussi similaires entre les lots traités et non traités de la variété Provence sur chacune des parcelles ("Be", "Co", "Du", "Sa").

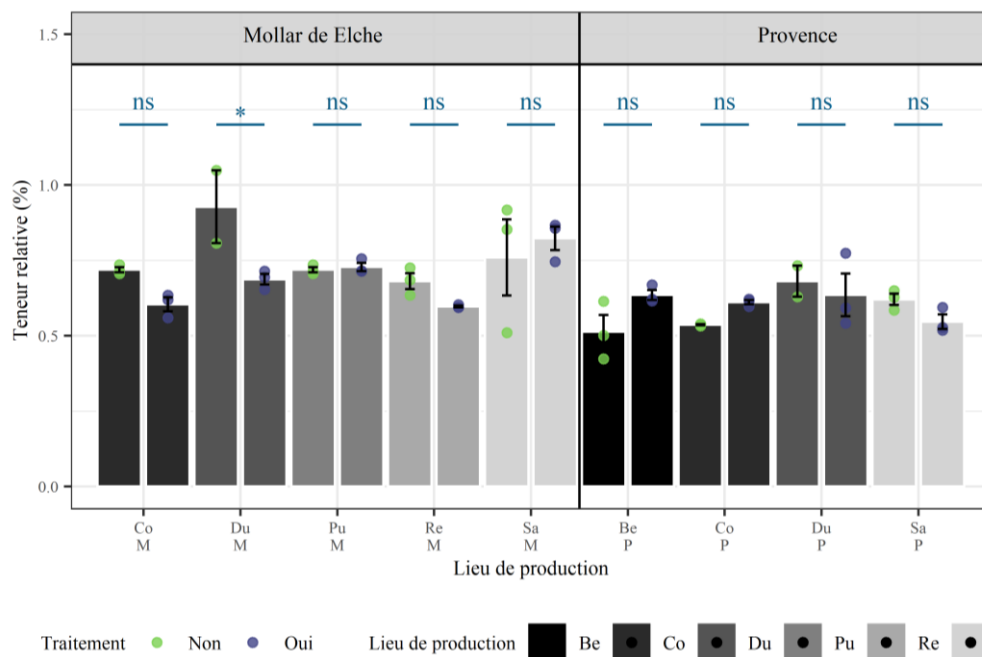


Figure 3.26 : Effet du traitement foliaire sur la teneur en acide  $\beta$ -éléostéarique des co-produits de pressage des graines de grenades. La teneur en acide  $\beta$ -éléostéarique (%) des échantillons est représentée par des points vert (lots non traités,  $n=3$ ) ou violet (lots traités,  $n=3$ ) par variété. Les moyennes (barres) sont colorées de gris foncé à gris clair pour, dans l'ordre, les parcelles "Be", "Co", "Du", "Pu", "Re", "Sa". Les teneurs en acide  $\beta$ -éléostéarique des co-produits de pressage des lots ne pouvant être comparés sont grisées. La significativité est représentée par les symboles "ns" : non significatif, "\*" : significatif  $p < 0,05$ , "\*\*" : significatif  $p < 0,01$ , "\*\*\*" : significatif  $p < 0,001$ , "\*\*\*\*" : significatif  $p < 0,0001$ .

La variété Mollar de Elche contient plus d'acide  $\beta$ -éléostéarique que Provence sur les trois parcelles avec des cultures conjointes, néanmoins l'écart entre les deux variétés est faible. Le lieu de production influence la teneur en acide  $\beta$ -éléostéarique pour Mollar de Elche selon le traitement appliqué, mais n'a pas d'influence pour Provence. Pour les lots non traités et traités, la parcelle "Re" semble produire les co-produits avec les teneurs minimales. Pour les autres localisations, l'effet du traitement change les tendances. Par exemple, le traitement foliaire diminue la teneur en acide  $\beta$ -éléostéarique pour "Du", donc la teneur relative des co-produits sur cette parcelle est différente de la parcelle "Re" sans traitement, mais similaire avec traitement. L'application de bore et de zinc modifie uniquement la teneur relative en acide  $\beta$ -éléostéarique des co-produits de la variété Mollar de Elche cultivée sur la parcelle

“Du”. Les teneurs en acide  $\beta$ -éléostéarique sont équivalentes sur les autres parcelles ainsi que sur toutes les localisations où Provence est cultivée. Cependant d'après les résultats de l'effet de la localisation, il semblerait qu'il puisse exister une différence entre les parcelles traitées et non traitées de Mollar de Elche non détectée. Les teneurs des deux isomères de l'acide punique, les acides  $\beta$ -éléostéarique et catalpique, devraient suivre les mêmes tendances d'après les résultats précédents. En effet, la variété Mollar de Elche contient aussi plus d'acide catalpique que la variété Provence, avec des teneurs relatives respectives de 0,9 et 0,8, 0,9 et 0,7, 1,0 et 0,9 % sur les parcelles “Co”, “Du”, “Sa” non traitées. Les teneurs en acide catalpique de la variété Provence sur les quatre parcelles sont similaires, avec des valeurs moyennes de 0,8, 0,9, 0,9, 0,7 pour les parcelles “Be”, “Co”, “Du” et “Sa” respectivement. Les co-produits de pressage issus de la parcelle “Re” non traitée semblent contenir une teneur équivalente à la parcelle “Du” (0,9 %), et ceux issus des grenadiers traités de la parcelle “Sa” une teneur relative supérieure ou similaire (1,0 %) aux parcelles “Re” et “Co” (0,8 et 0,9 %, respectivement).

### 3.3.2.b.iii. Discussion

La variété, la localisation et le traitement foliaire affectent les teneurs en acides punique et  $\beta$ -éléostéarique de manière distincte. **La teneur en acide punique n'est pas influencée par la variété, alors que Mollar de Elche présente des teneurs en acide  $\beta$ -éléostéarique plus élevées.** La localisation affecte la teneur relative en acide punique pour les deux variétés, alors que seule Mollar de Elche est concernée pour la teneur en acide  $\beta$ -éléostéarique. Le traitement diminue la teneur en acide punique pour Provence et ne change pas celle de Mollar de Elche, et a l'effet inverse sur la teneur en acide  $\beta$ -éléostéarique avec une diminution de la teneur pour Mollar de Elche et aucun effet pour Provence. **Les teneurs en acides gras corrélées avec celles des acides punique et  $\beta$ -éléostéarique semblent, pour la majorité, affectées de la même manière par les conditions de culture.**

Les variations observées des teneurs en acides gras à chaîne de carbone plus ou moins longue (C16, C18, C20) et de leur degré d'insaturation (0, 1, 2, 3) peuvent être dues à un changement du métabolisme des lipides dans les graines de grenades. Les lipides dans les plantes sont essentiels dans la structure des membranes cellulaires grâce à leurs propriétés hydrophobes, et particulièrement dans les graines, ils constituent un réservoir énergétique [224]. Ces dernières années leurs rôles de messagers cellulaires ont aussi été décrits résultant d'interaction avec les protéines, ainsi que vecteurs de liaison protéine-protéine, ou protéine-membranes, ou protéine-organite [224,343]. Les lipides majoritaires retrouvés dans les plantes sont constitués de chaînes d'acide gras saturées et insaturées sous forme de glycérolipide ou triacylglycéride (TAG) retrouvés dans les corps lipidiques.

Les chaînes d'acides gras insaturées ont des rôles plus particuliers de réserve pour la barrière extracellulaire sous forme hydroxyacide et acide carboxylique, de précurseurs d'autres biomolécules, et de régulateurs dans la réponse aux stress [225]. Les insaturations leur confèrent notamment l'habilité de protéger la cellule contre le stress oxydant en réagissant préférentiellement avec les espèces réactives de l'oxygène (ROS) [78]. Les principales classes d'acide gras insaturés à chaîne de 18 carbones et leurs rôles dans la plante sont présentés sur la figure 3.27.

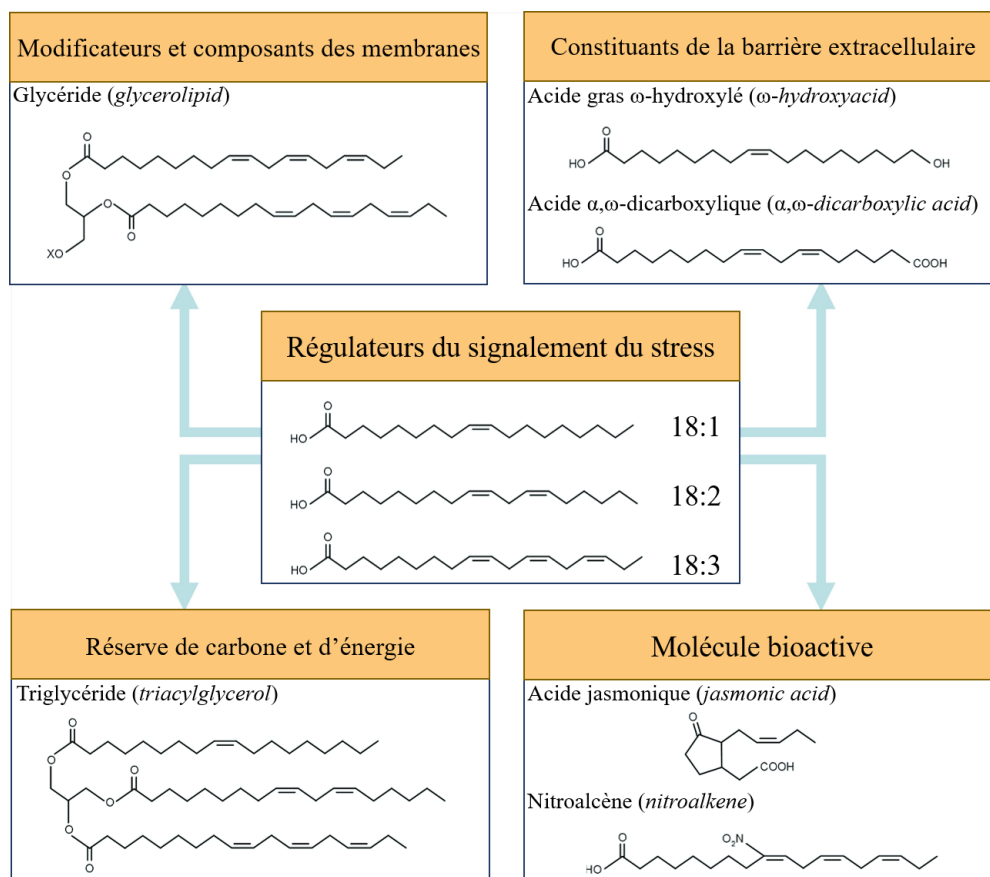


Figure 3.27 : Rôles des familles d'acides gras insaturés à 18 carbones dans les plantes. Reproduit depuis He et Ding. [225]

Les acides gras sont synthétisés dans les plastes puis assemblés dans le réticulum endoplasmique [224], tels que décrit dans l'organisme modèle *Arabidopsis* [344]. Dans leur voie de biosynthèse, les enzymes clés contrôlant la longueur de chaîne font partie du complexe acide gras synthase (*fatty acid synthase* FAS), et celles supervisant le degré d'insaturations sont les acide gras désaturases (*fatty acid desaturase* FADs) [344]. L'expression de ces enzymes est régulée par les besoins énergétiques de la cellule (stockage ou utilisation) qui dépendent du stade de développement, du stress, de la lumière *via* le contrôle de facteurs de transcription [344].

Dans la graine de grenade les acides gras poly-insaturés conjugués à 18 carbones sont majoritaires et notamment l'acide punicoïque (C18:3,ctc) mais aussi ses isomères les acides  $\beta$ -éléostéarique (C18:3,ttt) et catalpique (C18:3,ctt) sous la forme de triacylglycérade [92,190,345]. Plusieurs FADs ont été décrites dans la grenade [345–347] et d'autres espèces [348–351] produisant des acides linoléiques conjugués. Les FADs sont nommées en fonction de leur activité catalytique, les FAD-1 ajoutent une double liaison au précurseur de l'acide stéarique pour former le précurseur de l'acide oléique (9(Z)-C18:1), les FAD-2 transforment le précurseur de l'acide oléique en acide linoléique (9(Z),12(Z)-C18:2), les FAD-3 produisent le précurseur de l'acide linoléique, et les FADX produisent les acides linoléiques conjugués (C18:3) *via* la transformation d'une double liaison de l'acide linoléique (9(Z),12(Z)-C18:2) en deux doubles liaisons conjuguées et sont donc aussi appelées

acide gras conjugases. La voie de biosynthèse de l'acide punique et les FAD impliquées sont présentées sur la figure 3.28.

Les FADs sont aussi caractérisées par leur chimiosélectivité avec la mention " $\Delta^n$ ", n étant le carbone ciblé. Par exemple la FAD-1 peut être une C18:0 $\Delta^9$ -désaturase lorsqu'elle transforme l'acide stéarique en acide oléique. Des études sur la spécificité et la sélectivité de ces enzymes ont montré que leur origine et environnement influencent les substrats acceptés et les produits générés. Par exemple, la localisation cellulaire des C16:0-désaturases d'*Arabidopsis* (cytoplasme, plaste) gère leur activité catalytique, dans le cytoplasme l'enzyme est une C16:0 $\Delta^9$ -désaturase alors qu'elle a une activité C16:0 $\Delta^7$ -désaturase dans le plastide [352]. Les FADX de *Aleurites fordii* (tung), *Trichosanthes kirilowii* et de grenade permettent de générer l'acide  $\alpha$ -éléostéarique pour la première et l'acide punique pour les suivantes à partir d'acide linoléique, mais ont aussi une activité de désaturase produisant les dérivés 9(Z),12(E)-C18:2 et 9(Z),12(E)-C16:2 à partir de respectivement les acides oléique (9(Z)-C18:1) et palmitoléique (9(Z)-C16:1) [348,353]. La FADX de grenade montre aussi une spécificité variable car malgré son activité préférentielle de C18:2 $\Delta^{12}$ -conjugase produisant l'acide punique à partir de l'acide linoléique, elle peut aussi accepter l'acide  $\gamma$ -linoléique (6(Z),9(Z),12(Z)-C18:3) et produire le dérivé 6(Z),9(Z),11(E),13(Z)-C18:4, mais ne réagit pas avec les acides  $\alpha$ -linoléique (9(Z),12(Z),15(Z)-C18:3) et homo- $\gamma$ -linoléique (8(Z),11(Z),14(Z)-C20:3) [346]. Ces spécificités et sélectivités résulteraient de plusieurs éléments des domaines et sites catalytiques de ces enzymes, qui sont en cours d'étude [351,354]. Les études ne mentionnent pas pour la plupart les proportions d'isomères des acides linoléiques conjugués produits et donc la stéréosélectivité des FADX. Néanmoins les travaux de Cahoon et al. [355] sur la FADX de *Momordica charantia* montrent la production des isomères de l'acide  $\alpha$ -éléostéarique bien qu'ils ne soient pas quantifiés car leur teneur relative est inférieure à 2 %. Rawat et al. [351] ont démontré que la modification de deux co-produits de la FADX de *Momordica charantia*, catalysant nativement la transformation d'acide linoléique en acide  $\alpha$ -éléostéarique, engendre une production d'acide punique en parallèle de l'acide  $\alpha$ -éléostéarique.

Les variations observées des teneurs relatives en acides punique (9(Z),11(E),13(Z)-C18:3) et eicosénoïque (9(Z)-C20:1) des co-produits de pressage des graines de grenades sont inversement proportionnelles aux teneurs en acides gras saturés ou à plus faible degré d'insaturation. Cette tendance pourrait résulter d'une plus faible expression des FADs contrôlant la production des acides punique et eicosénoïque, conduisant à l'accumulation des acides gras précédents dans la voie de biosynthèse et donc à plus faible nombre d'insaturations. De plus, l'absence de corrélation entre les teneurs en acide punique et ses isomères peut être expliquée par la sélectivité des FADs. En effet, l'expression de plusieurs FADs pourraient être contrôlée différemment et conduire à des teneurs en acides linoléiques conjugués indépendantes les unes des autres, les facteurs de l'étude pourraient influencer la sélectivité de la FADX qui produirait, selon les conditions de culture, plus ou moins d'acide punique et de ses isomères, indépendamment du niveau d'expression de l'enzyme.

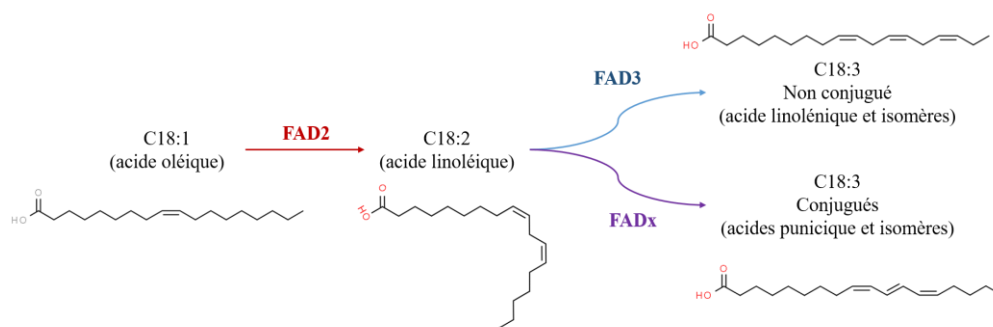


Figure 3.28 : Voie de biosynthèse simplifiée de l'acide punicique. Reproduit depuis Wang et al. [347] et He et al. [344].

La diversité génétique existant entre les variétés de grenades [200,317] pourrait être à l'origine de variations de la régulation de l'expression et/ou des sites catalytiques des FADx et ainsi modifier les teneurs en acides  $\beta$ -éléostéarique et punicique observées dans les co-produits de pressage des graines, de l'ordre de 30 et 16 % supérieures respectivement pour Mollar de Elche que pour Provence. Au vu des teneurs en acide punicique équivalentes entre les deux variétés (moins de 1 % d'écart entre Mollar de Elche et Provence), il semblerait que l'hypothèse d'un changement de sélectivité de l'enzyme soit aussi probable que la présence d'une seconde FADx exprimée de manière différente entre les deux variétés.

Les paramètres agro-écologiques affectant la production des acides gras *via* la régulation de l'expression des FADs sont notamment la température ambiante, la luminosité, les facteurs de stress (oxydant, hydrique, salin) et principalement le stade de développement [225,356]. Par exemple, les hautes températures (27-35 °C) diminuent l'expression des FADs ou les détériorent ce qui provoque de plus faibles teneurs en acides gras, alors que les basses températures (4-6 °C) promeuvent leur expression et entraînent l'effet inverse [225]. Les dommages, causés par des contaminations ou des altérations physiques, en produisant un stress oxydant peuvent diminuer la proportion d'acides gras poly-insaturés, qui sont la première cible des espèces réactives de l'oxygène (ROS), mais qui peut être compensée par la surexpression des FADs dans certains organismes. L'expression des FADs est aussi contrôlée par la luminosité et le stade de développement de la plante par une redirection des flux de matière carbonée vers la croissance de la plante plutôt que vers le stockage sous la forme de triacylglycéride (TAG) [356].

Les relations entre les teneurs en acide punicique et  $\beta$ -éléostéarique et les températures minimales, moyennes et maximales mesurées pendant le développement des fruits ont été évaluée par la méthode de Pearson, et les figures sont données en Annexe. Les teneurs en acides punicique et  $\beta$ -éléostéarique des co-produits de pressage des graines toutes variétés et localisations confondues ne sont pas corrélées ( $R < 0,65$ ,  $p > 0,05$ ) aux températures minimale, moyenne et maximale mesurées en moyenne sur la période de développement des grenades sur les parcelles ce qui tend à montrer que la température ambiante n'explique pas les variations observées entre les parcelles. Cependant l'ensemble de la fructification ne correspond pas à une phase constante de production des TAG étant donné qu'ils sont plutôt produits à maturité lorsque la graine doit

stocker de l'énergie, et nous avons montré que les deux variétés semblent produire des teneurs variables en acides gras.

Les températures maximales moyennées sur une semaine avant la récolte (entre 20 et 28 °C) montrent une corrélation fortement positive ( $R=0,95$ ,  $p<0,05$ ) avec la teneur en acide punicique des co-produits de pressage des graines Mollar de Elche non traitée. **Plus la température ambiante mesurée est élevée, plus la teneur en acide punicique des co-produits est élevée.** D'après les résultats précédents, cela se traduirait aussi par des plus faibles teneurs en acides gras à plus faible degré d'insaturation et saturés.

Au vu du peu d'informations sur la régulation des FADX des grenades de la variété Mollar de Elche, plusieurs hypothèses peuvent émerger.

Les températures maximales élevées pourraient conduire à la répression ou à l'altération des FADs produisant les acides gras saturés et à faible degré d'insaturation (FAD-1,2) sans altérer l'expression ou l'activité des FADX produisant l'acide punicique, ce qui conduirait à de plus hautes teneurs relatives en acide punicique liées à de plus faibles teneurs en acides gras moins insaturés. Les températures maximales plus élevées pourraient aussi être à l'origine d'un stress pallié par la graine par la production d'acide gras poly-insaturés à destination des membranes cellulaires au vu de leur plus faible viscosité que les acides gras moins insaturés *via* la surexpression des FADX, conduisant à une teneur relative plus élevée en acide punicique parmi les acides gras totaux. Les acides gras conjugués poly-insaturés étant la première cible des ROS, il semble peu vraisemblable qu'un stress oxydant lié à l'augmentation de la température de 20 à 28 °C puisse générer de plus hautes teneurs en acide punicique.

D'autre part, les températures minimales moyennées sur une semaine avant la récolte (entre 9 et 16 °C) sont corrélées négativement ( $R=-0,87$ ,  $p<0,1$ ) avec la teneur relative en acide  $\beta$ -éléostéarique des co-produits de pressage des graines Provence. **Des faibles températures minimales pourraient donc impliquer des plus hautes teneurs en acide  $\beta$ -éléostéarique**, ce qui pourrait résulter d'un changement dans la sélectivité d'une FADX liée à la température, ou de la surexpression d'une FADX spécifique à cet acide gras poly-insaturé dans les graines de grenades de la variété Provence.

Ces résultats valident la différence existante entre les deux variétés étudiées par leurs réponses aux températures ambiantes, et expliquent en partie les variations des teneurs en acides gras entre les parcelles. De plus, cela suggère que l'expression des FADs et FADX de Mollar de Elche et Provence pourraient ne pas être régulées de la même manière bien qu'étant sensibles à la température ambiante comme décrit dans la littérature. Les enzymes de la biosynthèse des acides gras de Mollar de Elche seraient sensibles aux températures maximales de 20 à 28 °C, alors que celles de Provence montreraient une sensibilité aux températures minimales entre 9 et 16 °C. Néanmoins, des conclusions plus précises nécessiteraient de plus amples recherches sur les voies de biosynthèse des acides gras et leurs régulations dans la grenade, par exemple avec des études transcriptomiques.

Parmi les autres facteurs qui pourraient aussi expliquer les variations entre les lieux de production, le stade de maturité des fruits a été développé dans les parties précédentes,



et les fruits potentiellement moins mûrs de la localisation “Sa” pourraient être à l’origine de teneurs relatives en acide punicoïque plus faibles. En effet, comme explicité ci-dessus, l’accumulation d’acides gras insaturés dans les graines s’effectue principalement à maturité pour faire des réserves de matière carbonée. **Par conséquent, une plus faible teneur relative en acide punicoïque dans les co-produits de pressage des graines pourrait résulter d’une phase de développement moins avancée du fruit.** Les différences de développement peuvent être issues de charges différentes des grenadiers ou de retard de fructification engendré par, comme précisé dans la partie précédente, les gelées tardives de 2019. Les parcelles étudiées ont des textures proches, limoneuses avec une proportion argileuse ou sableuse variable, adéquates pour la culture [327] qui ont été irriguées de manière à éviter la sécheresse. Par conséquent, la texture du sol et le stress hydrique ne semblent pas être à l’origine des variations entre les parcelles. Néanmoins, d’autres conditions culturales telles que la luminosité ou des facteurs de stress oxydant pourraient aussi expliquer la surexpression ou le changement de sélectivité des FADs entre les parcelles.

Sur la parcelle “Du” sans traitement, la proportion d’acide  $\beta$ -éléostéarique est plus élevée que sur la parcelle “Re” pour la variété Mollar de Elche, suggérant une plus grande sélectivité de la FADX pour cet acide gras vis à vis de l’acide punicoïque, ou une expression différente de deux FADX produisant les isomères d’acide linoléique conjugués. Ces modifications de la voie de biosynthèse de l’acide  $\beta$ -éléostéarique ne sont pas expliquées par les températures ambiantes mesurées sur les parcelles comme développé précédemment, et pourraient donc être engendrées par d’autres facteurs environnementaux comme la luminosité ou le stade de développement. Les teneurs relatives en acide  $\beta$ -éléostéarique et catalpique sont inférieures à 1 % des acides gras totaux et par conséquent, bien qu’intéressantes à expliquer, leurs variations sont négligeables par rapport à l’ensemble des acides gras quantifiés et présents dans l’huile de grenade.

Pour les deux variétés de grenades non traitées, dans l’ensemble, les co-produits de pressage des graines des parcelles “Sa” et “Co” contiennent respectivement des valeurs plus faibles et plus élevées d’acide punicoïque. Ces variations peuvent résulter de la surexpression des FADX générant l’acide punicoïque ou de la répression de l’expression des enzymes générant les acides gras moins insaturés (acides palmitique, stéarique, oléique et linoléique avec les acides gras synthases FAS et les FADs). Pour la variété Mollar de Elche, ces variations pourraient résulter partiellement de la température ambiante maximale la semaine précédant la récolte comme décrit ci-dessus. Cependant, étant donné que les deux variétés semblent être affectées de la même manière par le lieu de production, les autres paramètres culturaux pourraient être à l’origine des variations entre les parcelles, et notamment la différence du stade de développement des grenades. Les teneurs en acide punicoïque sur les différentes parcelles sont comprises entre 80,3 et 83,7 % pour les deux variétés confondues sans traitement donc des variations de l’ordre de 4 % des acides gras totaux.

Le traitement foliaire constitué de bore et de zinc affecte les teneurs en acides gras des deux variétés de manière distincte. La teneur relative en acide punicoïque reste inchangée entre les lots traités et non traités de la variété Mollar de Elche et diminue pour la variété Provence, alors que la teneur en acide  $\beta$ -éléostéarique est similaire pour les lots non traités et traités de la variété Provence et diminue pour la variété Mollar

de Elche. D'après les relations entre les teneurs en acides gras décrites précédemment, l'application foliaire de bore et zinc entraînerait donc une augmentation des teneurs en acides gras saturés et à faible degré d'insaturation de la variété Provence en parallèle de la diminution des teneurs en acides punicoïque et eicosénoïque. Les nutriments pulvérisés sur les feuilles sont mobiles dans les plantes [341], et plus particulièrement des études portant sur l'application foliaire de bore et du zinc dans l'oranger et le tournesol respectivement ont montré que ces nutriments sont transférés à travers la plante *via* le phloème [338,357]. Dans la grenade, le bore est classifié comme mobile dans la plante [358] et est retrouvé en plus grande quantité dans les fruits après l'application de bore et de zinc [188], de même que le zinc. Cette translocation des nutriments des feuilles vers les fruits explique l'effet observé du traitement foliaire sur le profil d'acides gras des co-produits de pressage des graines de grenades.

Comme développé dans la partie précédente *Influence des conditions de culture sur les polyphénols des péricarpes*, les rôles du bore et du zinc dans les plantes ont été décrits depuis de nombreuses années bien que certains mécanismes sous-jacents restent encore à déterminer. Le bore est impliqué dans les métabolismes primaires, secondaires et la stabilisation des membranes cellulaires, alors que le zinc est principalement lié au métabolisme primaire et a un rôle important dans les interactions entre les métabolites, principalement des protéines mais aussi des lipides membranaires. Bien que des études aient démontré une influence du bore sur les lipides présents dans plusieurs plantes dont les graines de *Camelina sativa* [359], l'olive [360] et la grenade [188], son effet sur la régulation des enzymes de la voie de biosynthèse des acides gras n'est pas encore documenté [361]. Le traitement foliaire à base de zinc influence aussi les lipides contenus dans les plantes comme dans le maïs où les teneurs en acide oléique, linoléique et linoléique sont plus élevées et la teneur en acide stéarique similaire après pulvérisation foliaire de zinc [362]. Ces changements dans le maïs pourraient résulter du contrôle de l'expression des FADs et FAS liée à l'apport de zinc, mais aucune étude ne porte actuellement sur la biosynthèse des acides gras en particulier étant donné l'importance des principales voies métaboliques affectées par cet élément. En effet, le zinc est impliqué dans de nombreux processus cellulaires dont les processus enzymatiques, la synthèse des protéines, et la gestion des radicaux de l'oxygène sur les membranes cellulaires [363]. La présence du nutriment lié aux lipides et protéines membranaires les protège de l'action néfaste des radicaux de l'oxygène tout en prévenant leur transfert à l'intérieur de la cellule [363] et par conséquent la détérioration des composés insaturés et conjugués qui constituent leur cible principale [364]. Ce dernier rôle explique une augmentation de la teneur en acides gras poly-insaturés après l'apport foliaire de zinc, ce qui est en contradiction avec les observations de notre étude. En effet, nos résultats montrent que le traitement foliaire à base de bore et de zinc génère une diminution de la teneur relative en acide punicoïque concordante avec une augmentation des acides gras à plus faible degré d'insaturation et saturés, ce qui semble contraire à l'effet protecteur escompté par l'apport de zinc et suggère que d'autres phénomènes sont à prendre en compte. Plusieurs hypothèses peuvent être émises :

- (i) La pulvérisation foliaire de bore et de zinc génère un stress engendrant la dégradation des acides gras poly-insaturés. Cette hypothèse est peu vraisemblable car le traitement a été appliqué sur les feuilles, et les

concentrations phytotoxiques des deux éléments sont beaucoup plus élevées que celles appliquées.

- (ii) L'effet de la pulvérisation de bore masque l'effet bénéfique du zinc sur la teneur en acides gras poly-insaturés. Cette hypothèse est aussi peu vraisemblable car les deux nutriments sont impliqués dans le maintien de l'intégrité des membranes cellulaires directement (zinc et potentiellement bore) ou indirectement (potentiellement bore).
- (iii) Les deux nutriments remplissent leur rôle de stabilisation des membranes cellulaires mais l'un et/ou l'autre est aussi impliqué dans la régulation de la voie de biosynthèse des acides gras. Une promotion des enzymes FAS et FADs produisant les acides saturés et à faible degré d'insaturation et l'absence de régulation de l'expression des FADX produisant l'acide punicique et ses isomères générerait alors une plus faible teneur relative en acide punicique après le traitement. Cette évolution pourrait être similaire si les nutriments ne contrôlent pas l'expression des FAS et FADs mais promeuvent celles des FADX. La première option semble plus plausible car le lien entre la présence de zinc et une augmentation des teneurs en acides gras insaturés de type oléique, linoléique et linoléique a déjà été démontré [362] et concernerait donc plutôt l'expression des FADs.
- (iv) L'apport de zinc et/ou de bore influence indirectement l'expression des enzymes de la voie de biosynthèse des acides gras car augmentent et/ou diminuent les teneurs d'autres nutriments [365] qui ont un effet sur ces enzymes. La pulvérisation foliaire des deux éléments sur le grenadier entraîne une élévation des teneurs en fer, manganèse et cuivre des fruits [188]. Parmi ces trois éléments, le manganèse aurait des interactions avec les voies de biosynthèses des acides gras présents dans les graines et, selon sa teneur et l'espèce considérée, pourrait promouvoir la production d'acide oléique au détriment d'acide linoléique, donc de degré d'insaturation plus faible.

Comme dit précédemment, les FADX générant les acides gras poly-insaturés conjugués retrouvés dans la grenade ont très peu été étudiées, notamment leur régulation par les nutriments. Les connaissances actuelles sur l'intérêt et les dommages causés par l'apport ou la déficience en bore et zinc montrent que beaucoup de phénomènes entrent en jeu et impliquent le métabolisme primaire, les membranes cellulaires, la protection contre les stress biotiques et abiotiques et l'absorption d'autres nutriments. Yang et al. ont montré que dans deux espèces *Vernicia* et *Jatropha* les gènes des enzymes de la biosynthèse des acides gras sont différents et que les mécanismes de régulation des FADs sont aussi propres à chaque plante (parmi huit gènes de régulation identifiés, trois sont exprimés différemment) [366]. **L'effet de la pulvérisation foliaire de bore et de zinc sur le profil en acides gras de la grenade à l'échelle moléculaire doit donc être évalué spécifiquement pour cette plante et peut partiellement être déduit des études sur d'autres espèces.**

### 3.4. Conclusion

L'influence des conditions de culture du grenadier sur la teneur en composés à valeur ajoutée des co-produits de pressage des grenades a été étudiée à travers l'évolution des polyphénols des péricarpes et des lipides des co-produits de pressage des graines.

Le rendement d'extractibles au méthanol et les teneurs en polyphénols totaux et individuels (punicalagine, punicaline, acide ellagique) quantifiés respectivement par dosage colorimétrique de Folin-Ciocalteu et HPLC des péricarpes des grenades sont du même ordre de grandeur que ceux décrits dans la littérature, et font partie des valeurs les plus hautes. La punicalagine, un ellagitannin, est le polyphénol majoritaire retrouvé dans les péricarpes devant la punicaline et l'acide ellagique. La quantification des polyphénols totaux permet donc d'obtenir aussi un ordre de grandeur de la teneur en punicalagine dans les conditions opératoires utilisées, et *vice versa*.

Le rendement en huile et le profil d'acides gras des co-produits de pressage des graines sont aussi en accord avec les données publiées, l'acide gras majoritaire est l'acide punicoïque, un acide gras poly-insaturé conjugué de la famille des oméga-5. Sa teneur relative se situe aussi parmi les teneurs les plus hautes décrites dans la littérature, alors que le rendement en huile des co-produits de pressage des graines est dans la moyenne. Les teneurs relatives en acide punicoïque et eicosénoïque, les deux acides gras avec les degrés d'insaturation les plus élevés pour les longueurs de chaîne de 18 et 20 carbones respectivement, sont inversement proportionnelles aux teneur des acides gras avec un nombre plus faible d'insaturations pour les longueurs de chaîne correspondante. Cela suggère une régulation différente des voies de biosynthèse des acides gras à haut et faible degré d'insaturation entraînant l'accumulation de certains au détriment des autres, ou une altération préférentielle des acides gras les plus insaturés comme décrit dans d'autres études générant une teneur relative plus élevée des acides gras moins insaturés.

Les teneurs en polyphénols et lipides décrits dans les co-produits de grenade occitane font partie des valeurs les plus élevées décrites. Les méthodes extractives de cette étude semblent donc performantes, en termes de rendement ou de préservation des composés à valeur ajoutée. De nombreuses études ont par ailleurs montré l'influence de la température, la durée et le mode d'extraction sur les extractibles de la grenade (chapitre 1). D'autres paramètres pouvant avoir un effet sur la composition chimique des co-produits seront développés dans les chapitres suivants : la durée de conservation des grenades avant leur transformation et la génération des co-produits (chapitre 4), et le conditionnement des co-produits avant leur analyse (chapitre 5).

Au-delà de l'amélioration de ces teneurs dans le but de valoriser des co-produits de grenade enrichis en polyphénols et lipides, les données de cette étude complètent les connaissances actuelles sur l'influence des paramètres agro-écologiques et climatiques influençant les polyphénols spécifiques des péricarpes et les lipides de grenade, qui pour ces derniers sont retrouvés presque exclusivement dans la partie interne des graines restant intactes après le pressage.

Deux variétés de grenades ont été sélectionnées en accord avec les pratiques agricoles des producteurs locaux basées sur les caractéristiques organoleptiques et les rendements en jus, ainsi que leur adaptation aux conditions pédoclimatiques du sud de la France. **Les teneurs en polyphénols des péricarpes de ces grenades sont influencées par la variété, alors que le profil d'acides gras des co-produits de pressage semble moins affecté.** En effet, les péricarpes de la variété Provence contiennent en moyenne plus de polyphénols et de punicalagine que Mollar de Elche, et plus précisément sur deux parcelles parmi les trois localisations où les deux variétés

sont cultivées. La teneur relative de l'acide gras majoritaire, l'acide punique, ne révèle pas de différence entre les variétés bien que les teneurs des autres acides gras diffèrent, en particulier les isomères de l'acide punique, les acides  $\beta$ -éléostérique et catalpique, sont retrouvés à des teneurs plus élevées dans Mollar de Elche que dans les co-produits de Provence. Les variations des teneurs en composés à valeur ajoutée des co-produits de grenade entre les variétés ont été prouvées dans de nombreuses études, et notamment celles des teneurs en polyphénols entre Mollar de Elche et Provence. Ces résultats sont cohérents avec les études récentes ayant mis en évidence la forte diversité génétique entre les variétés. Toutes les étapes de la voie de biosynthèse des ellagitannins de grenade et d'autres espèces en produisant ne sont pas encore élucidées contrairement aux acides gras poly-insaturés. Néanmoins les enzymes mises en jeu pour la production des acides gras poly-insaturés conjugués majoritaires de la grenade (FADX) n'ont pas été toutes identifiées à ce jour dans toutes les variétés.

Pour établir les variations des teneurs en composés à valeur ajoutée des co-produits issus de ces variétés soumises à différentes conditions pédoclimatiques, six parcelles situées dans 4 départements d'Occitanie ont été retenues, "Be", "Co", "Du", "Pu", "Re" et "Sa". L'analyse des données morphologiques des grenades des différentes parcelles n'a pu être approfondie avec une haute fiabilité du fait des volumes variables de fruits par lot, mais la couleur des grenades Mollar de Elche issues de la localisation "Sa" sembleraient indiquer un manque de maturité, qui serait lié à l'épisode de gel survenu en 2019 ayant altéré la fructification sur cette parcelle et potentiellement d'autres parcelles de l'étude. L'intérêt d'employer des parcelles exploitées est multiple et notamment les écarts observés entre les parcelles reflètent la réalité du terrain ainsi que les aléas climatiques. En contrepartie, l'interprétation des résultats et la détermination des facteurs influençant ces résultats sont plus complexes. Cette étude faisant partie d'un projet global à forte implication dans la filière grenade, il nous a semblé plus pertinent d'utiliser les lots de grenades des producteurs locaux plutôt que des parcelles expérimentales pour caractériser les co-produits de grenade. Les teneurs en composés à valeur ajoutée des péricarpes et co-produits de pressage des graines observées représentent donc bien celles des co-produits générés à travers l'Occitanie. De plus, l'analyse des lots de grenades des parcelles ayant été touchées ou non par les gelées tardives reste pertinente pour obtenir une fourchette plus large et donc représentative de la variabilité des teneurs en polyphénols et lipides des co-produits.

La localisation des parcelles et les méthodes de culture influencent les teneurs en polyphénols totaux, punicalagine, punicaline et acide ellagique des péricarpes avec des valeurs multipliées jusqu'à 1,8 selon les parcelles et les composés. Malgré des variations entre les variétés, les localisations "Du" et "Sa" semblent conduire à de plus faibles teneurs en polyphénols totaux et punicalagine dans les péricarpes de grenade. De même, les teneurs relatives en acides gras évoluent entre les lieux de production bien que les tendances ne soient pas similaires pour les deux variétés. Les teneurs en acides  $\beta$ -éléostérique et catalpique des co-produits de la variété Mollar de Elche varient entre les localisations alors que celles de Provence ne changent pas significativement. Les teneurs en acides punique et eicosénoïque évoluent à l'inverse des acides gras à longueur de chaîne correspondante à plus faible degré d'insaturation entre les différentes parcelles différemment selon la variété. Néanmoins deux tendances similaires entre Mollar de Elche et Provence apparaissent avec la

localisation "Co" montrant des teneurs élevées en acide punique, et la localisation "Sa" des teneurs plus faibles. Les causes de ces variations inter-parcelles sont complexes car pourraient mettre en jeu de nombreux facteurs pédoclimatiques dont les effets n'ont pas encore été décrits complètement dans la littérature sur la grenade. De plus, parmi les études disponibles, aucune ne porte sur la variété Provence, endémique de la région, dont l'adaptation au territoire pourrait modifier les réponses physiologiques aux conditions environnementales. Les facteurs potentiellement influents dans notre étude sont la charge des arbres, le stade de développement, la température pendant le développement du fruit et à maturité, la luminosité, et le stress biotique. Les facteurs pouvant être écartés ou peu importants dans notre étude sont le stress hydrique et le type de sol car les parcelles ont été irriguées et ont des textures proches. La parcelle "Sa" produisant les co-produits avec les teneurs les plus faibles en polyphénols et acide gras, et comportant une partie de fruits potentiellement moins mûrs, il semblerait que le stade de développement, et par conséquent la période de récolte et les épisodes de gels, ait une influence très importante sur les composés à valeur ajoutée des co-produits de grenade quelle que soit la variété considérée. De plus, les variations de l'effet des conditions environnementales sur les composés ciblés des co-produits entre les deux variétés étudiées suggèrent que les mécanismes d'accumulation ou de dégradation de ces métabolites sont affectés différemment, et confortent l'hypothèse d'une grande diversité génétique.

Les grenadiers cultivés sur ces parcelles ont été soumis à un traitement contre l'éclatement, consistant en la pulvérisation foliaire de bore et de zinc dont l'effet a été évalué sur la teneur en composés à valeur ajoutée des co-produits. La masse des grenades de la variété Provence diminue de 18 % en moyenne après ce traitement alors que la variété Mollar de Elche n'est pas affectée. À l'inverse, la couleur de l'exocarpe de la variété Mollar de Elche est plus vert et jaune après la pulvérisation foliaire alors qu'aucun changement n'est observé pour la variété Provence. Les proportions de co-produits et de jus restent en moyenne constantes quels que soient la variété ou le traitement appliqué. Les variations morphologiques observées après pulvérisation foliaire de bore et de zinc dépendent de la variété ce qui pourrait résulter d'une sensibilité variable au traitement, ce qui est confirmé par les analyses des composés à valeur ajoutée contenus dans les co-produits de grenade. En effet, le traitement foliaire entraîne une augmentation des teneurs en polyphénols totaux et punicalagine, ainsi qu'une diminution des teneurs en polyphénols minoritaires (acide ellagique et punicaline) des péricarpes. Concernant les co-produits de pressage des graines, la teneur relative en acide punique diminue après le traitement de la variété Provence alors que la teneur en acide  $\beta$ -éléostérique diminue après le traitement de la variété Mollar de Elche. L'effet du traitement foliaire est variable selon la variété considérée ce qui confirme la variabilité génétique présente entre Mollar de Elche et Provence, notamment en rapport avec la régulation des voies de biosynthèse et de dégradation des ellagitannins et des acides gras. Dans les plantes les mécanismes expliquant l'influence d'un traitement foliaire à base de bore ou de zinc sont encore partiellement incompris au niveau moléculaire car très complexes. Par suite, très peu d'informations sont disponibles à cette échelle sur l'effet des deux nutriments combinés, dans la grenade particulièrement. D'après nos résultats et les données de la littérature, des pistes sont à explorer sur la régulation de la biosynthèse des polyphénols dans les péricarpes et des acides gras de la partie interne de la graine de grenade, et plus particulièrement sur les enzymes responsables de l'accumulation de la punicalagine et

de l'acide punicique ou des acides gras moins insaturés correspondants. De plus, l'influence du traitement foliaire sur les polyphénols présents dans les péricarpes dépend du lieu de production, ce qui pourrait être expliqué par les conditions environnementales lors de l'application du traitement ou d'un effet dépendant des conditions de culture. La deuxième hypothèse semble plus plausible étant donné que l'effet du traitement sur les acides gras des co-produits de pressage des graines n'est pas lié aux parcelles. Dans ce cas, les grenades cultivées dans un environnement verront le traitement efficace pour augmenter les teneurs en polyphénols totaux et punicalagine, alors que dans un autre environnement le traitement ne changera pas ces teneurs.

Les conditions de culture des grenadiers permettant de maximiser les teneurs en polyphénols totaux et majoritaire, la punicalagine, sont l'utilisation de la variété Provence avec application d'un traitement foliaire à base de bore et zinc, la récolte à pleine maturité, l'absence de gelées tardives sur des sols fertiles et irrigués. Les paramètres culturaux conduisant à la plus haute teneur relative en acide punicique des co-produits de pressage des graines de grenades sont similaires bien que les deux variétés non traitées puissent être employées, ou la variété Mollar de Elche traitée car l'application foliaire de bore et de zinc réduit cette teneur de moins de 1 %. Les bénéfices liés à l'augmentation des teneurs en polyphénols totaux (+7 % en moyenne) et punicalagine (+30 % en moyenne) des péricarpes de la variété Provence après traitement peuvent être considérés comme plus importants que les dommages liés à la baisse de la teneur en acide punicique (-1 %).

Ainsi, les recommandations pour obtenir des co-produits de grenade de qualité dans le sud de la France seraient finalement d'utiliser la variété Provence avec pulvérisation foliaire de bore et de zinc sur des parcelles fertiles et irriguées, ainsi que récolter les fruits à pleine maturité.

L'étude des conditions de culture pourrait être complétée par plusieurs autres campagnes de quantification des composés à valeur ajoutée des co-produits de grenade issus des mêmes variétés, parcelles et soumises au même traitement foliaire se déroulant sur plusieurs années, ce qui donnerait accès à la part de variabilité engendrée par les conditions climatiques. Les résultats obtenus dans cette première étude montrent que l'évaluation de la teneur en polyphénols totaux pourrait être suffisante pour déduire l'évolution de la teneur en punicalagine des péricarpes, ainsi que le profil d'acides gras des co-produits de pressage des graines.

Les campagnes suivantes pourraient donc s'appuyer sur ces deux analyses pour approfondir et affiner les facteurs environnementaux affectant la composition chimique des co-produits de grenade. Par exemple, il semblerait que les gelées tardives de 2019 aient eu une influence non négligeable sur les teneurs en polyphénols et lipides des co-produits des grenades de la parcelle "Sa". D'autres campagnes effectuées des années impactées ou non par de telles conditions climatiques sur cette parcelle permettrait d'apprécier la part effective de ces gelées, ou donnerait d'autres pistes à explorer. La complexité de l'influence du traitement foliaire à base de bore et de zinc pourrait aussi être réduite en appliquant chacun des nutriments séparés. Les connaissances sur l'impact de l'apport de ces nutriments sur la grenade et le grenadier étant limitées actuellement, une étude approfondie de l'évolution du transcriptome pourrait mettre en évidence les mécanismes sous-jacents à l'accumulation ou la

détérioration des composés à valeur ajoutée des péricarpes et partie interne de la graine de grenade. Une telle étude serait envisageable pour les lipides des graines de grenade car leur voie de biosynthèse a été élucidée intégralement et les séquences codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides gras poly-insaturés conjugués sont connues. En revanche, seuls des fragments de la voie de biosynthèse des ellagitannins sont accessibles actuellement. Après avoir élucidé intégralement celle-ci, les mêmes analyses pourraient être conduites pour comprendre l'accumulation de punicalagine au détriment de la punicaline et de l'acide ellagique.





**4. ÉTUDE DE L'IMPACT DES CONDITIONS  
DE CONSERVATION DES FRUITS SUR LA  
TENEUR EN COMPOSES A VALEUR  
AJOUTEE DES CO-PRODUITS**



L'amélioration de la qualité du jus de grenade produit en Occitanie a conduit les acteurs de la filière à transformer un mélange des variétés, qui permet, entre autres, de compenser l'effet millésime, c'est-à-dire l'inconstance des propriétés organoleptiques du jus d'une année à l'autre. Les variétés de grenades d'Occitanie ont une période de récolte étendue liée à des développements des fruits désynchronisés, phénomène qui est retrouvé pour la plupart des variétés de grenades à travers le monde [57]. Le mélange des variétés de grenades précoces et tardives nécessite des pasteurisations multiples des jus des premières, afin de maintenir son innocuité. Ce traitement thermique à répétition pourrait cependant avoir des effets délétères sur la qualité nutritionnelle du jus, et notamment les anthocyanes qu'il contient [58]. Pour éviter cette perte de qualité, les variétés précoces pourraient être conservées jusqu'à maturité des variétés tardives pour transformer l'ensemble des grenades au même moment.

Cependant, les méthodes de conservation doivent tenir compte des particularités de la grenade et notamment de la sensibilité aux conditions de conservation. Comme pour les fruits et légumes, des micro-organismes peuvent se développer selon la température de conservation, mais d'autres risques spécifiques à la grenade existent et notamment les « blessures liées au froid » ou « *chilling injuries* » lorsque la température de conservation des grenades est proche de 0 °C (chapitre 1). En sus du développement de micro-organismes altérant leur qualité, les grenades peuvent brunir, durcir, se flétrir, ou perdre de leur qualité à la suite de déshydratation, changement du taux de respiration et du métabolisme, ou activation d'enzymes (chapitre 1). La température, l'humidité relative et l'atmosphère de conservation des grenades semblent être les facteurs clefs influençant leur qualité.

Ce chapitre a pour objectif l'étude de l'influence de méthodes de conservation des grenades sur les aspects morphologiques des fruits et la teneur en composés à valeur ajoutée de leurs co-produits de transformation. Les méthodes mises en place visent d'une part le maintien de la masse, de la couleur et de l'aspect morphologique, et d'autre part l'évaluation de leur influence sur la teneur en polyphénols des péricarpes et des lipides issus des co-produits de pressage des graines.

## **4.1. Caractérisation qualitative des grenades et de leurs co-produits**

### **4.1.1. Caractéristiques variétales**

Les caractéristiques étudiées des grenades des variétés Mollar de Elche et Valenciana (figure 4.1) sont présentées sur la figure 4.2.



Figure 4.1 : Grenades des variétés Mollar de Elche et Valenciana avant conservation.

Les masses des grenades Mollar de Elche et Valenciana sont en moyenne de 207 g et 144 g, respectivement. La variété Mollar de Elche présente une masse significativement plus élevée que Valenciana ( $p < 0,001$ ).

Les coordonnées du système colorimétrique CIEL\*a\*b\* des grenades Mollar de Elche et Valenciana sont en moyenne de 66,3 et 67,0 pour la clarté  $L^*$  ; 29,7 et 37,7 pour la composante chromatique  $a^*$  ; et de 33,7 et 27,9 pour la composante chromatique  $b^*$ , respectivement. La couleur de l'exocarpe des deux variétés diffère par les composantes chromatiques  $a^*$  et  $b^*$  ( $p < 0,001$ ) alors que la composante de clarté  $L^*$  est similaire ( $p > 0,05$ ). Par conséquent, les grenades Mollar de Elche sont caractérisées par une plus faible valeur de  $a^*$  et une plus haute valeur de  $b^*$ , ce qui peut se traduire par une couleur plus verte et jaune, alors que les grenades Valenciana sont plus rouges.

Les taux d'éclatement, craquelure et de développement de micro-organismes représentent les altérations morphologiques perceptibles à l'œil nu sur les exocarpes des grenades. Ces taux sont inférieurs à 1 % pour la variété Mollar de Elche alors que 5, 21 et 0 % des grenades Valenciana sont respectivement éclatées, craquelées et contaminées. Les grenades Valenciana semblent donc plus altérées que les grenades Mollar de Elche avant conservation.

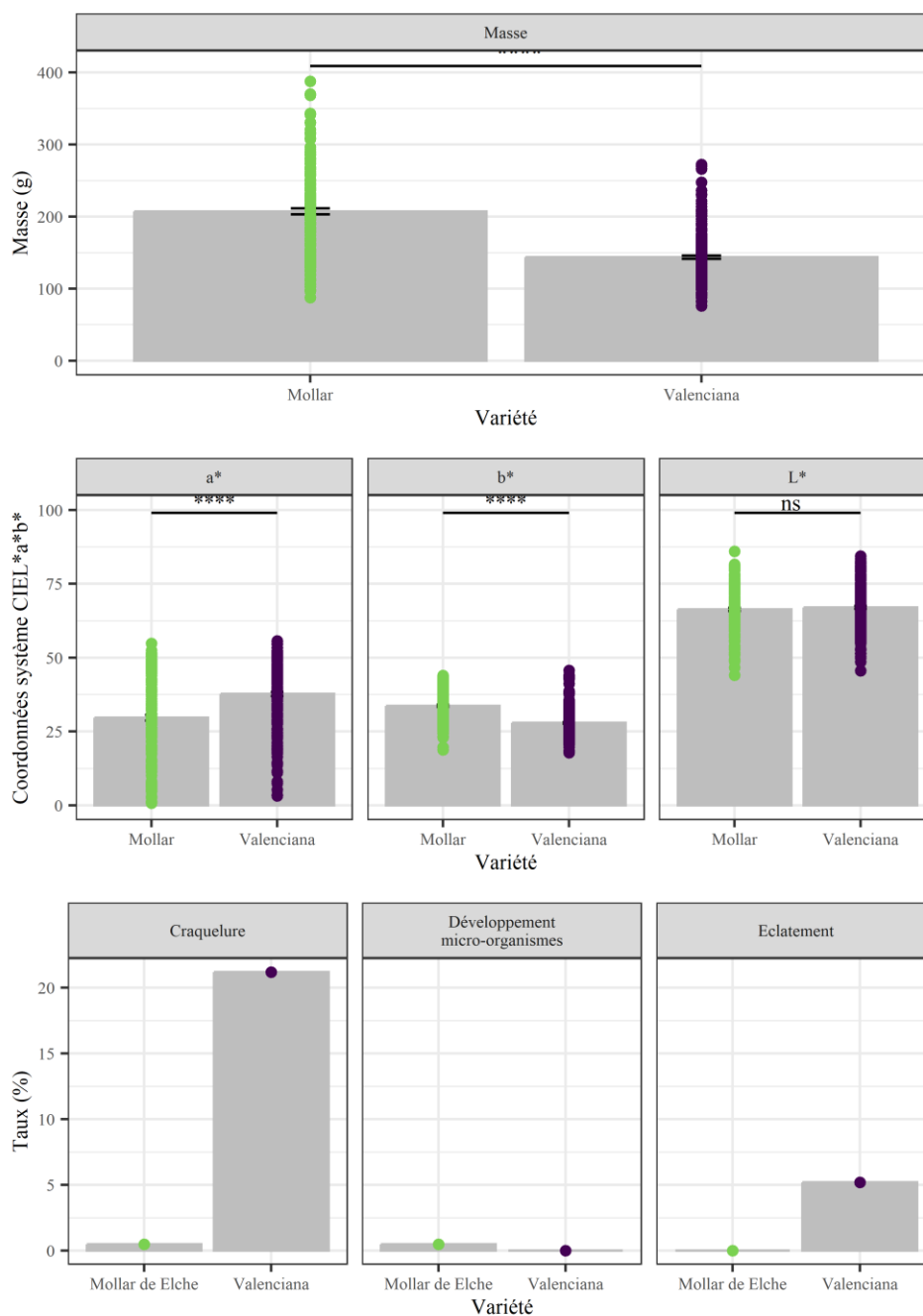


Figure 4.2 : Comparaison de la masse, la couleur et l'aspect des variétés étudiées Mollar de Elche ( $n=202$ ) et Valenciana ( $n=250$ ) avant conservation (témoin). Les caractéristiques des grenades de la variété Mollar de Elche sont représentées en vert et celles de Valenciana en violet, et les moyennes par variété sont données par les barres grises. Les taux d'éclatement, craquelure et développement de micro-organismes sont basés sur le nombre de fruits atteints sur l'ensemble des grenades Mollar de Elche ( $n=202$ ) et Valenciana ( $n=250$ ).

Les proportions des différentes parties des variétés Mollar de Elche et Valenciana sont présentées sur la figure 4.3. Elles ont été établies à partir de la transformation des lots de 10 grenades non conservées. Les deux variétés ont des rendements équivalents de péricarpes et co-produits de pressage de 44 % et 12 %, respectivement.

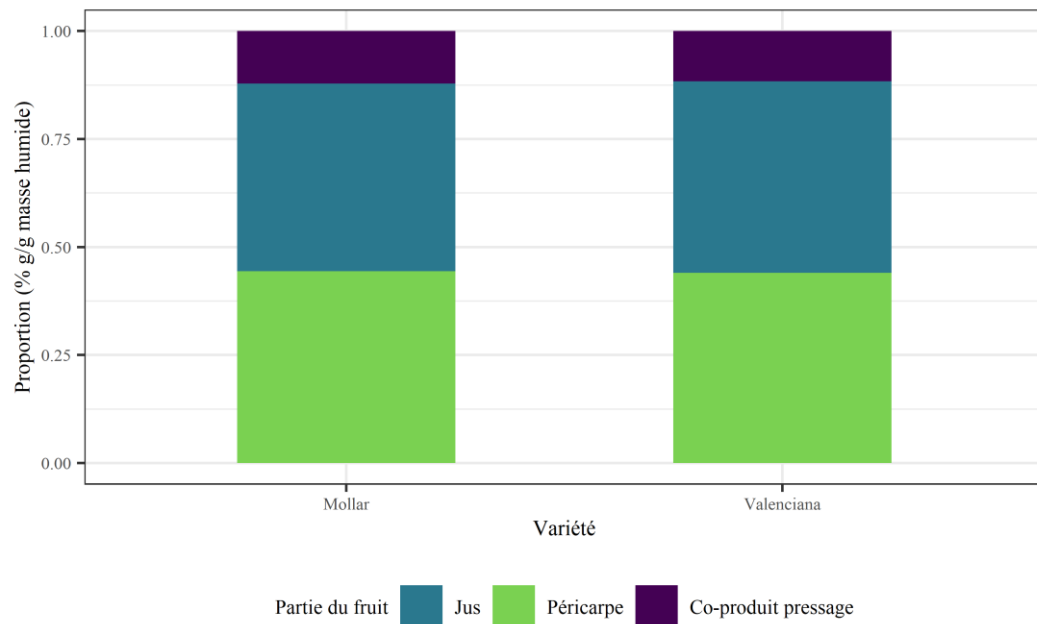


Figure 4.3 : Proportions de co-produits générés à partir des grenades des variétés étudiées Mollar de Elche ( $n=10$ ) et Valenciana ( $n=10$ ) avant conservation (témoin). Les rendements moyens de péricarpe, jus et co-produits de pressage des graines sont représentés respectivement en bleu, vert et violet par variété.

D'après leurs caractéristiques, les grenades Valenciana paraissent plus petites, plus rouges et plus altérées que les grenades Mollar de Elche, et les deux variétés contiennent des proportions similaires de co-produits. Dans le chapitre précédent, nous avons montré que la masse des grenades Mollar de Elche et Provence originaires de six lieux de culture avaient une masse similaire. Il semble donc que cette caractéristique dépende de la variété considérée. En revanche, les différences de couleur entre les grenades des itinéraires de culture résidaient principalement dans les composantes chromatiques, de la même manière que pour les variétés Mollar de Elche et Valenciana présentées ci-dessus. Les proportions de co-produits générés par la transformation des grenades, suivant le même procédé, étaient aussi similaires. Plus spécifiquement pour la variété Mollar de Elche, la masse décrite dans le chapitre précédent était  $245 \pm 34$  g, les coordonnées de l'espace colorimétrique CIEL\*a\*b\* étaient  $66 \pm 7$ ,  $19 \pm 19$  et  $37 \pm 6$  pour  $L^*$ ,  $a^*$  et  $b^*$ , respectivement. Ces résultats concordent avec les valeurs moyennes des grenades de ce lot, la légère différence concernant le paramètre  $a^*$  pouvant résulter des lots des parcelles atteintes par l'épisode de gel pendant la nouaison des fruits. L'origine des différences morphologiques entre variétés de grenades a été détaillée dans le chapitre 3 précédent. Les différences observées entre les deux variétés avant leur conservation pourraient conduire à des sensibilités variables à la conservation, qui vont donc être détaillées dans la partie suivante pour chacune des variétés.

### 4.1.2. Évolution des caractéristiques qualitatives au cours de la conservation

L'objectif est d'établir si les caractéristiques qualitatives des grenades changent au cours de leur conservation dans un premier temps, et si les conditions de conservation influencent ces changements dans un second temps. Les caractéristiques étudiées sont la masse, la couleur et l'altération externe des grenades.

L'évolution de la masse des grenades Mollar de Elche et Valenciana a été étudiée à l'aide de la perte de masse à la semaine  $n$  ( $1 < n < 8$ ), relative à la masse initiale (avant conservation, 0 semaine) afin de permettre la comparaison des grenades entre elles. De la même manière, la variation de la couleur des grenades a été suivie à l'aide de la différence de couleur ( $\Delta E$ ) entre les grenades conservées à la semaine  $n$  ( $1 < n < 8$ ) et avant leur conservation (0 semaine). Les méthodes de calcul sont détaillées dans le chapitre 2. Par conséquent, ces évolutions sont constituées de 16 ou 20 mesures chaque semaine pendant les quatre premières semaines puis de 8 ou 10 mesures des semaines 5 à 8, pour les grenades Mollar de Elche (16 puis 8 fruits) et Valenciana (20 puis 10 fruits) dans chacune des 12 conditions de conservation.

L'évolution de l'altération des grenades a été évaluée grâce aux taux d'altérations physiologique et microbienne, ainsi que physiques par craquelure et par éclatement des grenades, définis aussi dans le chapitre 2. Un taux a été calculé par lot de grenade, c'est-à-dire un taux par condition de conservation, par semaine, pour chacune des variétés, à partir de 16 ou 20 fruits les quatre premières semaines et 8 ou 10 fruits les quatre dernières semaines. De ce fait, l'évolution de ces taux au cours du temps et les effets des conditions de conservation sur ceux-ci sont étudiés qualitativement.

#### 4.1.2.a. Évolution de la masse des grenades

Les évolutions des masses relatives des grenades Mollar de Elche et Valenciana au cours des 8 semaines de conservation sont présentées respectivement sur les figures 4.4 et 4.5.

##### 4.1.2.a.i. Au cours de la conservation

Pour la variété Mollar de Elche (figure 4.4), la masse relative des grenades est en moyenne de - 8 % la quatrième semaine ( $n=192$ ) et de - 13 % la huitième semaine ( $n=96$ ). Cette diminution est significative ( $p<0,05$ ) au cours de la conservation sur 4 semaines ( $n=16*12$  conditions) et sur 8 semaines ( $n=8*12$  conditions) dans toutes les conditions. Néanmoins l'effet de la durée de conservation sur la masse relative des grenades est dépendant de la condition de conservation ( $p<0,001$ ), ce qui implique qu'il doit être évalué distinctement pour chacune ("S02"- "S13").

La masse des grenades diminue moins fortement dans les conditions "S03", "S05" et "S07", correspondant aux grenades conservées à humidité relative élevée et à 17 ou 4 °C avec ou sans acclimatation, et semblent même se stabiliser les premières et troisièmes semaines pour certaines ("S05" et "S07", respectivement), pour les grenades conservées 4 ou 8 semaines. Dans ces conditions la masse relative des grenades diminue jusqu'à 3 % après 4 ou 8 semaines alors que dans les autres



conditions la masse diminue de 5-21 % au bout de 4 semaines et de 9-28 % au bout de 8 semaines. La plus grande perte de masse est trouvée pour les grenades conservées à température et humidité relative ambiante (“S02”) pour lesquelles la masse relative passe de - 7 % la première semaine à - 21 % et - 28 % après 4 et 8 semaines de conservation, respectivement.

Pour Mollar de Elche, l'évolution de la masse relative des grenades, et par conséquent de leur masse, montre une diminution dans chacune des conditions de conservation, et cette tendance est similaire pour les lots conservés jusqu'à 4 et 8 semaines (n=16 et 8).

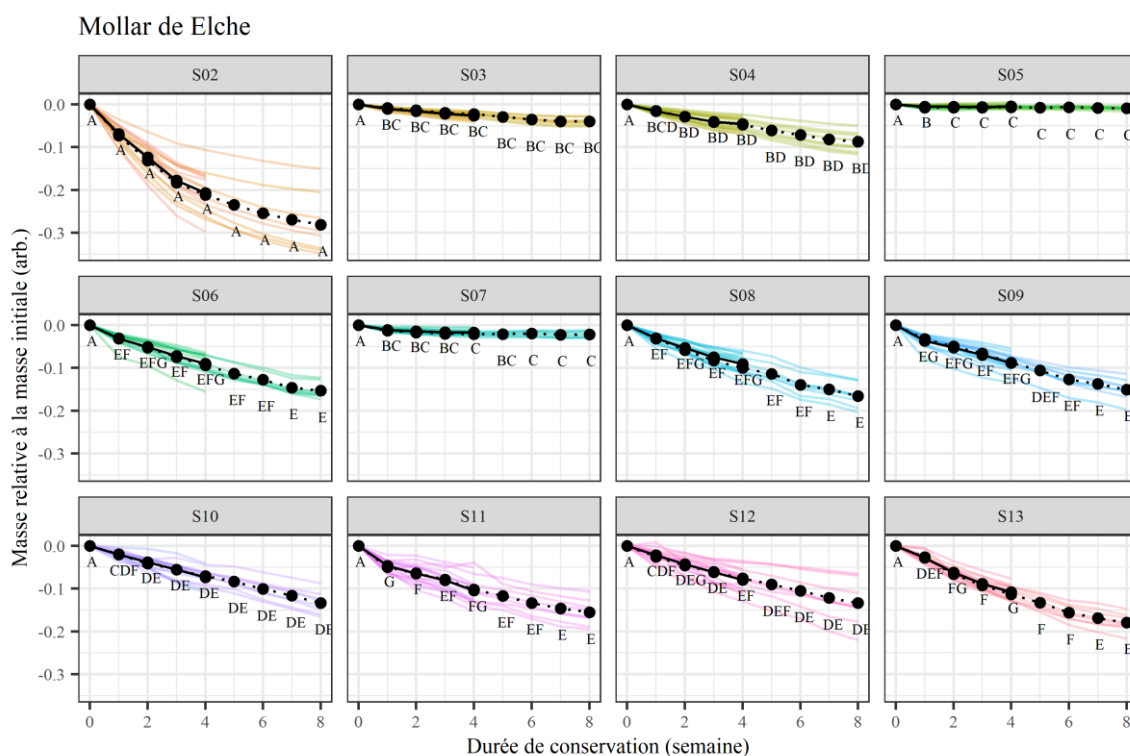


Figure 4.4 : Effet de la durée de conservation sur la masse des grenades de la variété Mollar de Elche (n=16 et 8). La masse relative à la masse des grenades initiales est représentée pour chaque fruit des 12 conditions de conservation en couleur, la moyenne pour l'ensemble des fruits (n=16 de 0-4 semaines et 8 de 5-8 semaines) par les points et lignes noirs. Les conditions de conservation sont indiquées sur les cadres de S02 à S13, et les paramètres correspondant de température, humidité relative et immersion sont reportés dans le tableau 2.4. Les lettres en majuscule différentes indiquent une différence significative (seuil 5 %) entre les conditions de conservation à la semaine n.

Pour la variété Valenciana (figure 4.5) la masse relative des grenades est en moyenne de - 12 % après 4 semaines (n=240) et de - 19 % la huitième semaine (n=120). Elle diminue significativement ( $p < 0,05$ ) quelle que soit la condition de conservation, et son effet est dépendant de la condition de conservation jusqu'à 4 et 8 semaines ( $p < 0,001$ ). Comme pour la variété Mollar de Elche, l'évolution de la masse relative des grenades au cours du temps doit donc être évaluée pour chaque condition (“S02”-“S13”).

Les conditions “S05” et “S07” semblent être celles pour lesquelles la masse diminue le moins au cours du temps jusqu'à 4 semaines (n=20) et 8 semaines (n=10) avec une diminution de 2-4 et 3-4 %, respectivement. La masse des grenades semble se stabiliser après 1 (“S05”), 5 (“S07”) et 6 (“S03”) semaines de conservation. Les

grenades Valenciana conservées dans les autres conditions jusqu'à 4 semaines (n=16) perdent jusqu'à 6 - 32 % de leur masse la quatrième semaine de conservation et jusqu'à 11-44 % la huitième semaine. La condition "S02", à température et humidité ambiantes, entraîne les pertes de masse les plus importantes au bout de 4 et 8 semaines, de 32 et 44 %, respectivement.

La masse des grenades Valenciana diminue donc dans chacune des conditions, et de manière similaire jusqu'à 4 et 8 semaines de conservation.

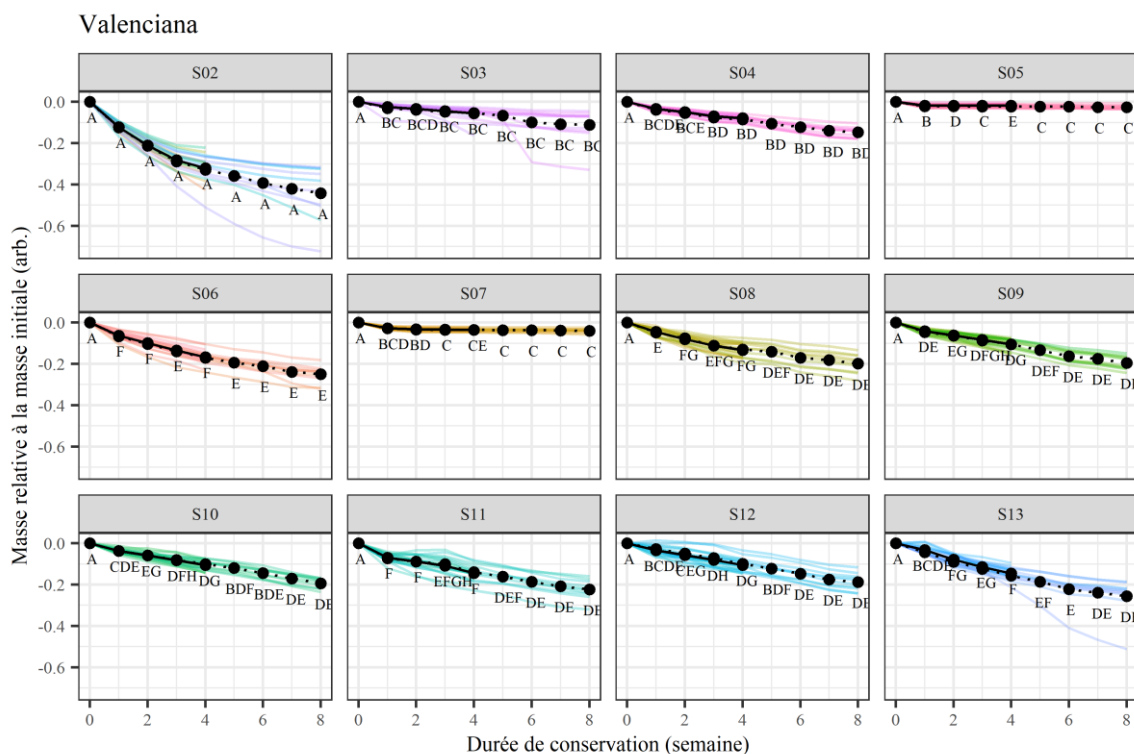


Figure 4.5 : Effet de la conservation des grenades Valenciana sur leur masse (n=20 et 10). La masse relative à la masse des grenades initiales est représentée pour chaque fruit des 12 conditions de conservation en couleur, la moyenne pour l'ensemble des fruits (n=20 les semaines 0-4 et 10 les semaines 5-8) par les points et lignes noirs. Les conditions de conservation sont indiquées sur les cadres de S02 à S13, et les paramètres correspondant de température, humidité relative et immersion sont reportés dans le tableau 2.4. Des lettres en majuscule différentes indiquent une différence significative (seuil 5 %) entre les conditions de conservation à la semaine n.

La masse relative des variétés de grenades Mollar de Elche et Valenciana évolue au cours du temps dans chaque condition de conservation et cette évolution dépend de la condition de conservation, pour les deux variétés. Après 8 semaines de conservation, les grenades Mollar de Elche (n=96) perdent entre 1 et 28 % de leur masse initiale, alors que les grenades Valenciana (n=120) perdent entre 3 et 44 %. La variété Valenciana semble donc plus sensible à la perte de masse, ce qui est cohérent avec ses caractéristiques déterminées avant la conservation. La diminution la plus rapide de la masse est observée à température et humidité ambiante ("S02"), et la plus lente à humidité contrôlée quelle que soit la température de conservation ("S03", "S05" et "S07").

De plus, l'évolution de la masse relative des grenades est semblable entre les lots de grenades conservées 4 et 8 semaines, cependant, le plus faible nombre de fruits présents dans les lots conservés 8 semaines (8-10 grenades) pourrait induire une perte d'information, c'est-à-dire moins de distinctions entre les conditions de conservation. L'étude de l'évolution de la masse des grenades au cours du temps nécessiterait donc un nombre de fruits minimal. En outre, les masses relatives des grenades Valenciana semblent plus hétérogènes que celles de Mollar de Elche. Cette hétérogénéité pourrait résulter de l'altération des grenades au cours de leur stockage, notamment la détérioration de leur péricarpe qui sera détaillée dans les parties suivantes. Cette variabilité est liée au vivant et son impact pourrait être réduit par l'augmentation du nombre de grenades par lot.

De nombreuses études ont porté sur la variation de la masse des grenades au cours de leur conservation pour éviter leur flétrissement qui diminue leur attrait commercial [29]. L'évolution observée par [221] est similaire à la nôtre sur 30 jours de conservation à température ambiante (20 °C) et humidité relative ambiante (65 %) ou élevée (95 %) de la variété Wonderful. En effet, une augmentation rapide de la perte de masse à faible humidité relative est retrouvée, alors que les grenades conservées à haute humidité relative ont une perte de masse équivalente à partir du douzième jour.

Cette perte de masse lors de la conservation des grenades est attribuée généralement à la transpiration [29] qui pourrait être liée à l'altération des membranes cellulaires [218,219] et au déficit de pression de vapeur, c'est-à-dire au phénomène spontané de diffusion simple de l'eau à travers les pores présents à la surface du fruit [213]. La perte d'eau des végétaux et des fruits en particulier s'effectue à travers les stomates à leur surface, structures contrôlant le passage des molécules à faible poids moléculaire comme l'eau et les gaz [213]. Par ailleurs des structures appelées lenticelles sont présentes sur l'exocarpe des grenades et, avec des micro-craquements, sont aussi à l'origine de la perte d'eau au cours du stockage [214]. Les études portant sur la perte de masse, la perte d'eau ou la dégradation des membranes cellulaires de la grenade et des fruits en général concordent sur l'importance de la variété, des conditions de culture et sur la prédominance des conditions de conservation des fruits sur ces phénomènes [29,216–219,221,367,368].

Malgré des différences dans leur amplitude, des tendances similaires apparaissent entre la perte de masse des deux variétés. Notamment, l'effet de la durée de conservation est dépendant de la condition de conservation pour les deux variétés. Par conséquent, l'impact des conditions de conservation sur la masse des grenades a été évalué chaque semaine, et pour chaque variété séparément pour les raisons données précédemment. Les différences significatives entre les conditions de conservation ("S02"-"S13") sont représentées par les lettres en majuscule sur les figures 4.4 et 4.5.

La condition de conservation a un effet significatif sur la masse relative des grenades Mollar de Elche conservées 4 (n=16\*12) et 8 semaines (n=8\*12) à chaque semaine de conservation (p<0,05). Cet effet est aussi significatif (p<0,05) pour les grenades Valenciana conservées 4 (n=20\*12) et 8 (n=10\*12) semaines.

La condition "S02", qui correspond aux conditions ambiante et à la température la plus élevée et l'humidité relative la plus faible, engendre une masse relative

significativement plus faible que toutes les autres ( $p < 0,05$ ) de 1 à 8 semaine(s) de conservation pour les deux variétés. Pour Mollar de Elche, à température et humidité ambiante ("S02") la perte de masse passe de 7 à 28 % de la première à la huitième semaine, et pour Valenciana elle varie de 12 à 44 % sur la même période. Cette condition correspond donc au témoin positif où les grenades perdent le plus de masse.

#### 4.1.2.a.ii. Effet de l'humidité

L'effet de l'humidité relative (ambiante et  $>92\%$ ) peut être déterminé par la comparaison des conditions de conservation à une température équivalente de  $17\text{ }^{\circ}\text{C}$  (conditions "S02" et "S03"), et de  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (conditions "S04" et "S05").

Comme dit ci-dessus, la condition "S02" engendre une perte de masse plus importante que toutes les autres conditions. Comparé à la condition "S03", de la première à la huitième semaine de conservation, les grenades Mollar de Elche et Valenciana perdent respectivement environs 90 % et 70-80 % de leur masse en plus dans la condition "S02" (tableau 4.1). A température ambiante ( $17\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), la diminution de l'humidité de 103 à 63 % entraîne donc une perte de masse plus importante.

Dans les conditions "S04" et "S05", la température mesurée est de  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  et l'humidité relative de 97 et 103 %, respectivement. La principale différence entre les deux conditions réside dans le fait que les grenades ont été conservées à l'air libre ("S04") ou dans des contenants hermétiques ("S05"). Pour Mollar de Elche et Valenciana, la première semaine, les masses relatives des conditions "S04" et "S05" ne sont pas significativement différentes ( $p > 0,05$ ). Néanmoins au cours des semaines suivantes, les masses relatives des grenades conservées à atmosphère ambiante sont significativement plus faibles ( $p < 0,05$ ) et un écart de 80 à 90 % et de 60 à 80 % pour Mollar de Elche et Valenciana, respectivement, se crée entre les deux conditions. Par conséquent, la conservation en chambre froide à humidité relative ambiante ("S04") pendant une semaine entraîne une perte de masse similaire à celle des grenades conservées dans des contenants à humidité contrôlée. Les fluctuations liées aux ouvertures et fermetures successives de la chambre froide au cours de la conservation jusqu'à 8 semaines peuvent être à l'origine d'un effet délétère sur la masse des fruits.

Tableau 4.1 : Effet de l'humidité sur la masse des grenades.

Durée conservation (semaine)	Masse relative S02 (%)	Masse relative S03 (%)	Variation S02-S03 (%)	Masse relative S04 (%)	Masse relative S05 (%)	Variation S04-S05 (%)
<b>Mollar de Elche</b>						
0	0	0		0	0	
1	-7	-1	-85	-2	-1	ns
2	-12	-2	-87	-3	-0	-82
3	-18	-2	-88	-4	-1	-86
4	-21	-3	-87	-5	-0	-89
5	-23	-3	-88	-6	-1	-88
6	-25	-4	-86	-7	-1	-90
7	-27	-4	-85	-8	-1	-90
8	-28	-4	-86	-9	-1	-89
<b>Valenciana</b>						
0	0	0		0	0	
1	-12	-3	-79	-3	-2	ns
2	-21	-3	-84	-5	-2	-64
3	-28	-5	-84	-7	-2	-74
4	-32	-6	-83	-8	-2	-77
5	-36	-7	-81	-11	-2	-78
6	-39	-10	-75	-12	-2	-81
7	-42	-11	-74	-14	-3	-82
8	-44	-11	-75	-15	-3	-83

ns : écart non significatif ( $p > 0,05$ ).

L'augmentation de l'humidité relative de 60 % (ambiante) à plus de 95 % (élevée) à 17 °C entraîne une diminution significative de la perte de masse des grenades des deux variétés Mollar de Elche et Valenciana conservées jusqu'à 4 ou 8 semaines. Cela corrobore l'hypothèse selon laquelle la diffusion des molécules d'eau à travers l'enveloppe des grenades est à l'origine de la perte de masse. Ces résultats sont en accord avec l'étude de [369] montrant une perte de masse 5 fois plus élevée lorsque les grenades Wonderful sont conservées à une température de 20 °C et humidité ambiante (65 %) qu'à humidité élevée (95 %). L'effet de l'humidité sur la perte de masse des grenades est donc important et pour maintenir leur masse il semblerait qu'une humidité relative élevée soit préférable.

#### 4.1.2.a.iii. Effet de la température

L'effet de l'augmentation de la température de 4,5 °C, avec ou sans acclimatation, à 17 °C sera présenté par la comparaison des conditions à une humidité relative supérieure à 92 %, c'est à dire les conditions "S03", "S05" et "S07" (tableau 4.2).

Pour la variété Mollar de Elche, il n'y a pas de différence significative ( $p > 0,05$ ) entre les conditions "S03" et "S05", et "S05" et "S07" à chaque semaine de conservation. Pour Valenciana, la même tendance est observée, sauf après 4 semaines de conservation pour laquelle la masse relative des grenades conservées dans la condition "S03" est 70 % plus faible que dans la condition "S05" ( $p < 0,05$ ). Dans l'ensemble, à humidité relative élevée, la température de conservation entre 4 et 17 °C avec ou sans

acclimatation ne semble pas influencer la masse des grenades Mollar de Elche et Valenciana après une à huit semaine(s) de conservation.

Tableau 4.2 : Effet de la température sur la masse des grenades.

Durée conservation (semaine)	Masse relative S03 (%)	Masse relative S05 (%)	Masse relative S07 (%)	Variation S03-S05 (%)	Variation S05-S07 (%)
<b>Mollar de Elche</b>					
0	0	0	0		
1	-1	-1	-1	ns	ns
2	-2	-0	-1	ns	ns
3	-2	-1	-2	ns	ns
4	-3	-0	-2	ns	ns
5	-3	-1	-2	ns	ns
6	-4	-1	-2	ns	ns
7	-4	-1	-2	ns	ns
8	-4	-1	-2	ns	ns
<b>Valenciana</b>					
0	0	0	0		
1	-3	-2	-3	ns	ns
2	-3	-2	-3	ns	ns
3	-5	-2	-3	ns	ns
4	-6	-2	-4	-68	ns
5	-7	-2	-4	ns	ns
6	-10	-2	-4	ns	ns
7	-11	-3	-4	ns	ns
8	-11	-3	-4	ns	ns

ns : écart non significatif ( $p > 0,05$ ).

La diminution de la température de 17 à 4,5 °C à humidité élevée entraîne une perte de masse similaire au cours du temps des grenades, et acclimater ces grenades à 15 °C pendant 10 jours ne change pas cette évolution. Tout d'abord, il semblerait que la masse des grenades Mollar de Elche et Valenciana évolue de manière similaire avec ou sans acclimatation préalable, sur une durée de conservation totale de 4 ou 8 semaines. La température moyenne locale au moment de la récolte des grenades proche de 15 °C dans la région peut expliquer ces observations. Ensuite, la conservation à 17 °C (température ambiante) ou 4,5 °C (température de chambre froide) n'affecte pas l'évolution de la masse des grenades Mollar de Elche qui semble donc peu influencée par la température de conservation comprise entre 4,5 et 17 °C. Certaines grenades de la variété Valenciana semblent à l'inverse sujettes à une perte de masse plus importante lorsqu'elles sont placées à 17 °C plutôt qu'à 4,5 °C. Un échantillon plus large de grenades de ces variétés obtenues sur plusieurs récoltes pourrait permettre de généraliser ces observations. La comparaison de la perte de masse de deux variétés de grenades Bhagwa et Ruby conservées à 5, 7 et 10 °C a montré des évolutions différentes au cours de leur conservation [368]. La perte de masse de la variété Bhagwa est similaire à 5 et 7 °C alors que celle de la variété Ruby augmente avec l'augmentation de la température de stockage, ce qui rejoint nos résultats concernant la variété Valenciana.

L'effet de la température de conservation des grenades Mollar de Elche et Valenciana originaires de France serait donc dépendant de la variété considérée et la perte de masse des fruits majorée par l'augmentation de la température pour certaines variétés.

#### 4.1.2.a.iv. Effet de l'immersion

L'effet de l'immersion des grenades (conditions "S08"- "S13") peut être évalué par comparaison avec la condition sans traitement ("S06"), à température et humidité relative équivalentes de 7,1 °C et 77 %, respectivement (tableau 4.3).

Comparé au témoin sans immersion ("S06"), l'immersion dans une solution de bicarbonate de sodium chauffé ("S11") diminue significativement ( $p < 0,05$ ) la masse relative des grenades Mollar de Elche après une semaine de conservation mais cette différence disparaît à partir de la deuxième semaine. Aucune différence significative n'est observée entre les autres lots de grenades immergées et le témoin non immergé. Les pertes de masses relatives dans ces conditions varient de 2-5 % la première semaine à 13-18 % la huitième semaine de conservation.

Contrairement à Mollar de Elche, l'immersion des grenades Valenciana avant leur conservation à 7,5 °C et 80 % d'humidité relative permet de limiter en partie la perte de masse jusqu'à 1 à 5 semaine(s) dans les conditions "S08", "S09", "S10", "S12" et "S13", correspondant à l'eau à 20 et 55 °C, les solutions de bicarbonate de sodium et d'*Aloe vera* à 20 °C et celle d'*Aloe vera* à 55 °C. Dans ces conditions, les pertes de masse sont 30 à 50 % plus faibles que le témoin sans immersion.

Tableau 4.3 : Effet de l'immersion des grenades sur la masse des grenades.

Durée conservation (semaine)	Variation S08-S06 (%)	Variation S09-S06 (%)	Variation S10-S06 (%)	Variation S11-S06 (%)	Variation S12-S06 (%)	Variation S13-S06 (%)
<b>Mollar de Elche</b>						
0						
1	ns	ns	ns	-49	ns	ns
2	ns	ns	ns	ns	ns	ns
3	ns	ns	ns	ns	ns	ns
4	ns	ns	ns	ns	ns	ns
5	ns	ns	ns	ns	ns	ns
6	ns	ns	ns	ns	ns	ns
7	ns	ns	ns	ns	ns	ns
8	ns	ns	ns	ns	ns	ns
<b>Valenciana</b>						
0						
1	-28	-33	-40	ns	-47	-47
2	ns	-39	-41	ns	-43	ns
3	ns	-37	-39	ns	-40	ns
4	ns	-38	-37	ns	-37	ns
5	ns	ns	-38	ns	-37	ns
6	ns	ns	ns	ns	ns	ns
7	ns	ns	ns	ns	ns	ns
8	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns : écart non significatif ( $p > 0,05$ ).

Pour la variété Mollar de Elche, la perte de masse des grenades est globalement similaire au cours de la conservation qu'elles aient été immergées ou non dans des solutions. Pour Valenciana, les lots conservés dans les conditions "S09", "S10" et "S12", c'est-à-dire après avoir été plongés dans de l'eau chaude, une solution de bicarbonate de sodium à 20 °C ou une solution d'*Aloe vera* à 20 °C présentent une perte de masse sensiblement inférieure au témoin, et cela de la première à la quatrième semaine de conservation.

D'une part, il semblerait que les deux variétés aient des sensibilités différentes à l'immersion, ce qui rejoint les précédentes études sur l'effet de conditions de stockage sur plusieurs variétés de grenades. D'autre part, la perte de masse des grenades Valenciana semblerait pouvoir être diminuée par leur immersion dans de l'eau chaude, du bicarbonate de sodium ou une solution d'*Aloe vera*. L'effet bénéfique de l'immersion dans l'eau chaude ou une solution de bicarbonate de sodium a déjà été montré pour les mandarines [370], avec jusqu'à 10 % de perte de masse en moins dans ces conditions.

L'effet de l'eau chaude a aussi été démontré dans les grenades *Ghojagh* par comparaison avec l'immersion dans de l'eau froide [216], avec aussi une perte de masse environ 10 % plus faible lorsque les grenades ont été plongées dans l'eau chaude avant leur conservation. D'autres études ont montré l'effet inverse de l'application d'eau chaude, et [367] suggèrent une détérioration potentielle de la cuticule des fruits conduisant à une plus large diffusion de l'eau vers l'environnement de conservation. Dans notre cas, la plus faible perte de masse des grenades pourrait résulter de la fermeture des stomates de l'exocarpe suite au stress thermique engendré par l'immersion dans l'eau chaude [367]. Au fur et à mesure de la conservation des grenades l'ouverture des lenticelles et la formation de micro-craquements pourraient contrebalancer cet effet ce qui expliquerait une perte de masse équivalente aux autres conditions à partir de 4 ou 5 semaines de conservation.

Le bénéfice de l'immersion dans la solution de bicarbonate de sodium sur la perte de masse des grenades pourrait être lié aussi à la modification de l'enveloppe des grenades. En effet, son application à la surface du citron induit une réorganisation de la cuticule couvrant les pores et des plaques de cire cristalline apparaissent puis se dégradent au cours de la conservation [371]. Un phénomène similaire pourrait expliquer l'effet protecteur du bicarbonate de sodium les premières semaines de conservation, puis, au fil du temps, la dégradation des structures sur l'exocarpe entraînerait une augmentation de la perte de masse comparable à celle des fruits non immergés.

Par ailleurs, le gel d'*Aloe vera* pourrait former une pellicule supplémentaire à la surface des grenades conduisant à un délai de la perte d'eau comme démontré pour de nombreux fruits [372] comme la fraise [373], la mangue [374] ou la goyave [375], présentant des structures externes variées avec des lenticelles et/ou des stomates. Les techniques d'imagerie ont montré que l'*Aloe vera* et d'autres enrobages de composition proche couvrent les stomates des fraises [373] mais aussi les lenticelles et micro-craquements à la surface de la tomate [376] créant une seconde barrière autour du produit pour prévenir la diffusion de l'eau. Au cours de la conservation cette barrière se détériore ce qui entraîne une perte d'eau et donc une perte de masse des



fruits, expliquant les résultats observés après 4 à 5 semaines de conservation des grenades.

L'immersion des grenades dans de l'eau chaude, du bicarbonate de sodium ou de l'*Aloe vera* permettrait donc de retarder la perte de masse des grenades sur une durée de quelques semaines, en fonction de la variété considérée et dans les conditions de conservation de 7,5 °C, 80 % d'humidité et atmosphère ambiante. Les procédés physico-chimiques à l'origine de cet effet seraient variables mais impliqueraient tous la fermeture ou l'obstruction des pores (stomates, lenticelles et micro-craquements) à la surface des fruits. Une analyse par imagerie haute résolution de la surface des grenades immergées, en parallèle de la mesure de la diffusion de l'eau et de la respiration, pourrait permettre de valider ces hypothèses observées sur d'autres fruits.

#### **4.1.2.a.v. Conditions de conservation optimales**

Pour la variété Mollar de Elche, seule l'humidité relative de conservation semble affecter la masse des grenades au cours de leur conservation. Par conséquent, les conditions à humidité relative élevée semblent les plus appropriées pour maintenir la masse de ces grenades. Dans nos essais, les conditions "S03", "S05" et "S07" sont celles présentant les humidités relatives les plus élevées, et une perte de 1 à 4 % de la masse des grenades a été relevée.

Pour la variété Valenciana, l'humidité relative semble affecter la masse des grenades mais aussi la température et l'immersion. Les conditions à humidité relative élevée, température basse et après avoir immergé les grenades dans de l'eau à 55 °C ou une solution de bicarbonate de sodium ou d'*Aloe vera* à 20 °C semblent limiter la perte de masse de ces grenades. Dans nos essais, la condition "S05" à haute humidité et faible température induit une perte de masse de l'ordre de 2 à 3 % de 1 à 8 semaines de conservation, et l'immersion dans les solutions précitées pourrait potentiellement réduire de 30 à 50 % la perte de masse.

#### **4.1.2.b. Évolution de la couleur des grenades**

Les figures 4.6 et 4.7 représentent l'évolution de la couleur des grenades des variétés Mollar de Elche et Valenciana, respectivement, par condition de conservation ("S02" - "S13"), et à l'aide de la différence de couleur ( $\Delta E$ ) entre la semaine de conservation  $n$  ( $0 < n < 8$  semaines) et avant leur conservation (0 semaine).

##### **4.1.2.b.i. Au cours de la conservation**

Les grenades Mollar de Elche conservées jusqu'à 4 et 8 semaines (figures 4.6) ont une différence de couleur en moyenne de 3,0 la première semaine ( $n=16$ ) à 5,3 la quatrième ( $n=16$ ) et jusqu'à 8,6 la huitième semaine ( $n=8$ ), toute condition de conservation confondue. L'hétérogénéité de la couleur entre les grenades d'une même condition semble augmenter au cours du temps dans la plupart des conditions de conservation.

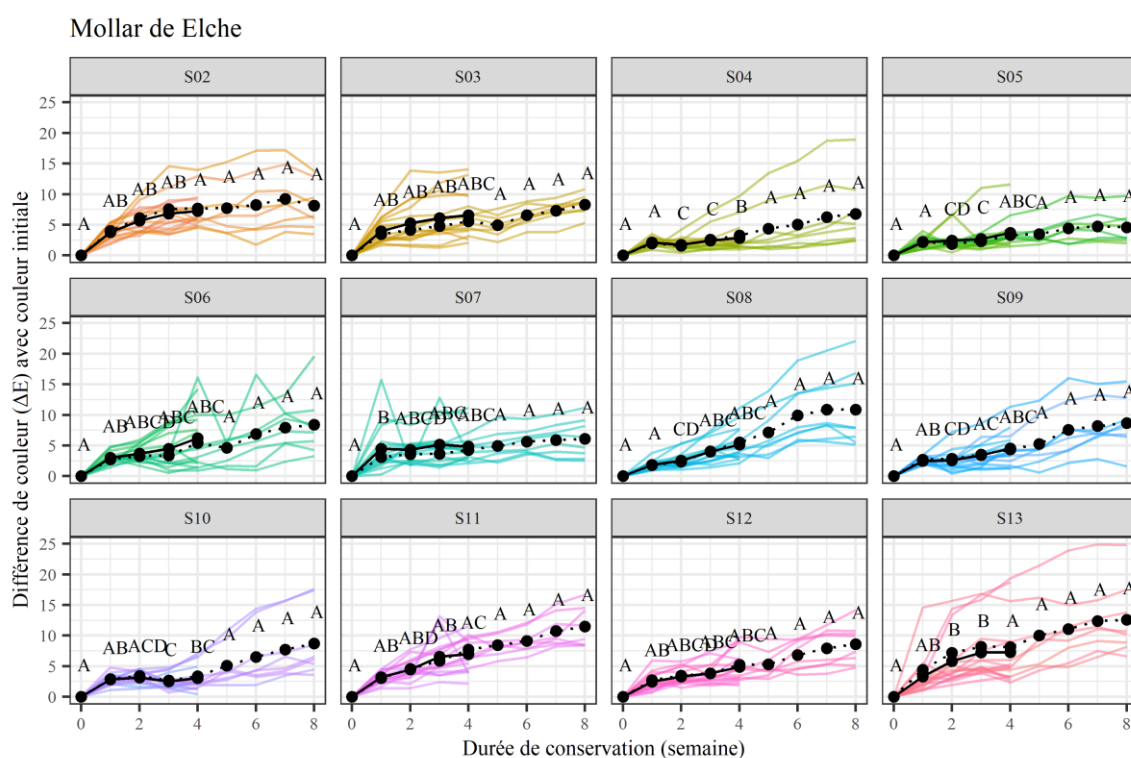


Figure 4.6 : Effet de la condition de conservation des grenades Mollar de Elche sur leur couleur à chaque semaine de conservation pendant 4 et 8 semaines ( $n=16$  et 8). Les lettres en majuscule différentes indiquent une différence significative (seuil 5 %) de changement de couleur à la surface des grenades entre les conditions de conservation pour chaque durée. Les conditions de conservation sont indiquées sur les cadres de S02 à S13, et les paramètres correspondant de température, humidité relative et immersion sont reportés dans le tableau 2.4.

Les grenades Valenciana conservées jusqu'à 4 et 8 semaines montrent un changement de couleur (figure 4.7) d'en moyenne 3,2 la première semaine ( $n=20$ ) jusqu'à 7,5 la quatrième semaine ( $n=20$ ) et 14,9 la huitième semaine ( $n=10$ ). Il semblerait que la condition "S03" entraîne un changement de couleur plus important au cours du temps que les 12 autres conditions, avec en moyenne une variation de 14,7 la semaine 4 et 30,2 la semaine 8. Le changement de couleur des grenades Valenciana est 1,5 fois plus élevé la quatrième semaine et presque 2 fois plus élevé la huitième semaine que celui de Mollar de Elche. Néanmoins, de la même manière que Mollar de Elche, les variations de couleur des grenades au sein des différentes conditions semblent hétérogènes.

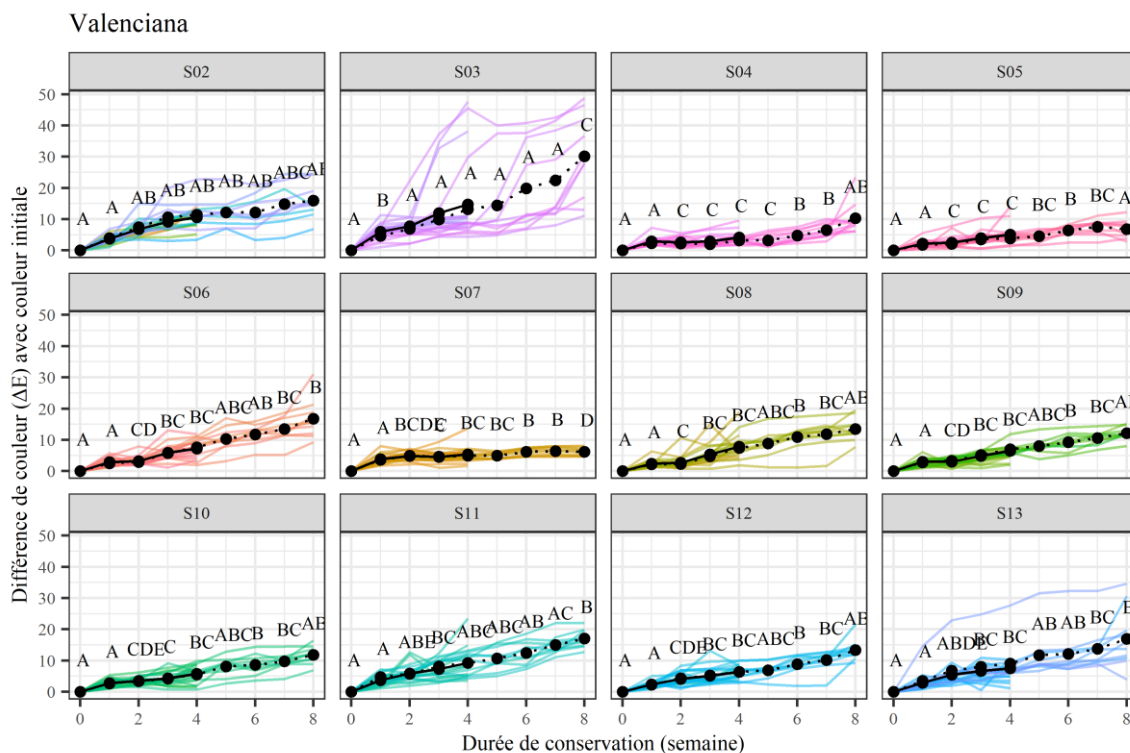


Figure 4.7 : Effet de la condition de conservation des grenades Valenciana sur leur couleur à chaque semaine de conservation pendant 4 et 8 semaines ( $n=20$  et  $10$ ). Les lettres en majuscule différentes indiquent une différence significative (seuil 5 %) de changement de couleur à la surface des grenades entre les conditions de conservation pour chaque durée. Les conditions de conservation sont indiquées sur les cadres de S02 à S13, et les paramètres correspondant de température, humidité relative et immersion sont reportés dans le tableau 2.4.

Dans l'ensemble des conditions de conservation, la couleur des grenades évolue au cours du temps et s'éloigne de la couleur initiale de manière significative ( $p < 0,0001$ ) mais dépendante de la condition de conservation ( $p < 0,01$ ). Pour les grenades Mollar de Elche, la variation de couleur est en moyenne de 3 la première semaine, 5 la quatrième semaine, et 9 la huitième semaine alors que celles de Valenciana valent respectivement de 3, 8 et 15. D'après une étude sur la conservation de la variété Wonderful [219], un changement de couleur de 15,7 a été estimé après deux mois à 2 °C ce qui est du même ordre de grandeur que celui de Mollar de Elche et Valenciana. Le changement de couleur des deux variétés semble similaire après la première semaine de conservation mais les grenades de la variété Valenciana montrent ensuite une variation deux fois plus élevée que celles Mollar de Elche. Le changement de couleur des grenades au cours de leur conservation semble donc dépendant de la variété, ce qui est en accord avec les observations faites lors de la conservation des grenades des variétés Bhagwa et Ruby par [368].

La représentation des coordonnées chromatiques  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  des grenades montre que le changement de couleur observé semble correspondre à une diminution de l'intensité de couleur et un assombrissement. Au cours du temps, les composantes  $a^*$  et  $b^*$  semblent se rapprocher de la zone correspondant aux couleurs associées au marron, et s'éloigner du rouge et du jaune de départ. En parallèle, la luminance  $L^*$  semble se rapprocher de 0, donc la couleur s'assombrit. Par conséquent, les évolutions des

couleurs moyennes des lots de grenades conservées 4 et 8 semaines semblent impliquer un brunissement des fruits.

A titre d'exemple, les figures 4.8 et 4.9 présentent d'une part les photographies des grenades Valenciana dans les deux premières conditions de conservation ("S02" et "S03"), et d'autre part l'évolution des composantes chromatiques de ces grenades au cours de la conservation. L'altération de la couleur à la surface des grenades est marquée dès la quatrième semaine de conservation dans les deux conditions, et cela se traduit par une diminution des coordonnées de l'espace colorimétrique  $L^*$ ,  $a^*$  et  $b^*$ .



Figure 4.8 : Grenades Valenciana conservées jusqu'à 4 et 8 semaines à température ambiante et humidité ambiante ("S02") ou contrôlée ("S03").

Sur l'ensemble des grenades étudiées, l'augmentation de la durée de conservation de 4 à 8 semaines entraîne des variations plus importantes du changement de couleur, ce qui est cohérent avec les tendances observées sur les lots conservés 4 semaines. Cette tendance est identique à celle reportée dans la littérature pour la variété Mollar de Elche [218] et d'autres variétés Bhagwa [368], Hicaznar [217], Ruby [368], et Wonderful [219,221].

De plus, comparé à la perte de masse étudiée précédemment, on observe une très grande hétérogénéité entre les fruits de chaque lot, c'est à dire entre les grenades conservées dans la même condition. Celle-ci engendre une distinction plus difficile de l'évolution de la couleur entre chaque semaine de conservation pour les lots affectés, et pourrait être diminuée par l'augmentation du nombre de grenades étudiées. Par ailleurs, cette variabilité pourrait résulter d'altérations physiologiques ou du développement de micro-organismes à la surface des grenades, altérant de manière plus importante la couleur observée. Les résultats concernant ce point seront développés dans la partie suivante.

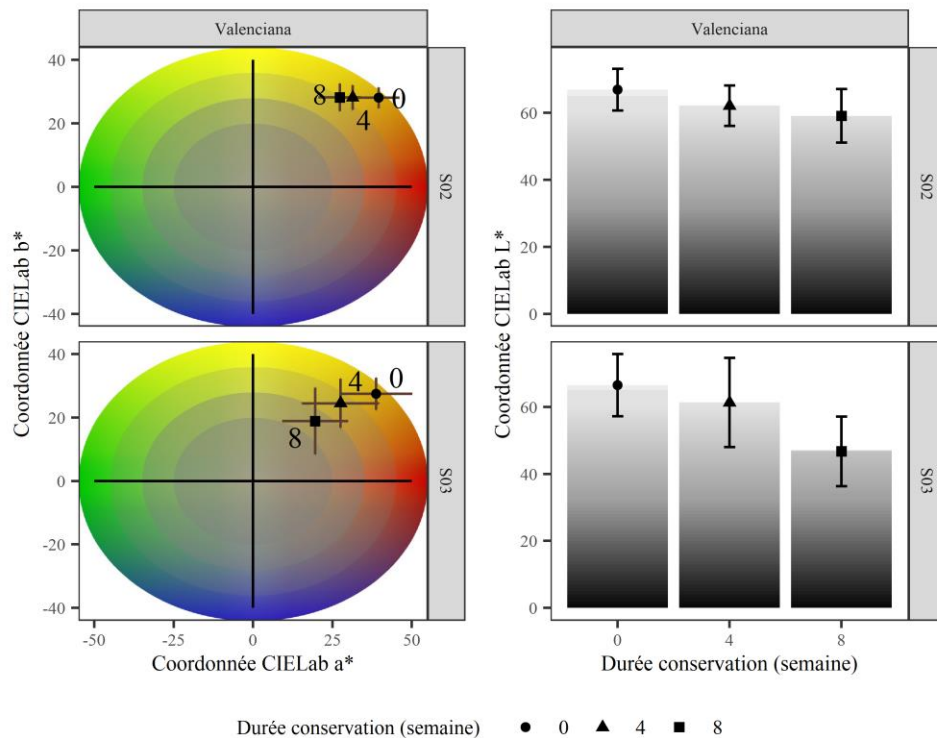


Figure 4.9 : Évolution des composantes chromatiques ( $a^*$  et  $b^*$ ) et de luminance ( $L^*$ ) des grenades Valenciana conservées jusqu'à 4 et 8 semaines à température ambiante et humidité ambiante ("S02") ou contrôlée ("S03"). Les coordonnées  $L^*$ ,  $a^*$  et  $b^*$  (système CIELAB) ont été moyennées pour les lots de grenades conservées 4 et 8 semaines par condition de conservation. Les coordonnées  $a^*$  et  $b^*$  représentant la partie chromatique sont représentées avec leurs couleurs correspondantes à gauche, et la durée de conservation des grenades de 0, 4 et 8 semaines représentée par respectivement un rond, un triangle et un cercle. La composante de luminance de la couleur est représentée à droite par les barres, et la durée de conservation croissante de 0 à 8 semaines.

Les évolutions de couleur des grenades Mollar de Elche semblent proches entre les conditions de conservation, alors que Valenciana semble montrer une variation plus importante dans la condition "S03" (température ambiante, 17 °C, et humidité relative supérieure à 92 %, 103 %). En effet, pour Mollar de Elche, la condition de conservation a un effet significatif sur le changement de couleur des semaines 1 à 4 ( $p < 0,001$ ) et dépendant de la semaine considérée ( $p < 0,001$ ) mais à partir de la cinquième semaine les changements de couleur ne sont plus significativement différents ( $p > 0,05$ ). A l'inverse, le changement de couleur des grenades Valenciana est significativement différent entre les conditions de conservation de la première à la huitième semaine de conservation ( $p < 0,001$ ) et cet effet dépend de la durée de conservation ( $p < 0,001$ ).

Pour les deux variétés conservées jusqu'à 4 semaines et pour Valenciana jusqu'à 8 semaines, la condition de conservation influence le changement de couleur, mais dépendamment de la semaine considérée. Par conséquent, l'effet des conditions de conservation (humidité relative, température et immersion) devra être établi pour chaque durée de conservation.

#### 4.1.2.b.ii. Effet de l'humidité relative

L'effet de l'humidité relative de conservation peut être établi par comparaison des conditions "S02" et "S03", c'est-à-dire après la conservation à 17 °C et 63 ou 103 % d'humidité relative, ou des conditions "S04" et "S05", pour lesquelles la température est de 4 °C et l'humidité relative de 97 ou 103 %. Pour ces deux dernières conditions, les grenades ont été conservées à atmosphère ambiante ("S04") ou dans des contenants hermétiques ("S05"), et les variations des conditions environnementales résident principalement dans les ouvertures et fermetures successives de la chambre froide.

Le changement de couleur des grenades Mollar de Elche moyen varie de 3,8 la première semaine (n=16) à 8,1 la huitième semaine (n=8) de conservation à température et humidité relative ambiantes ("S02"), et de 4,0 à 8,3 lorsque l'humidité relative est supérieure à 92 % ("S03"). Ces variations ne sont pas significativement différentes entre les deux conditions de conservation ( $p > 0,05$ ). Les grenades Mollar de Elche placées en chambre froide à humidité non contrôlée ("S04") montrent une variation de couleur de 2,1 à 6,8 entre les premières et huitièmes semaines de conservation, et celles placées à humidité contrôlée ("S05") de 2,2 à 4,6. Ces changements ne sont pas significatifs ( $p > 0,05$ ). Pour la variété Mollar de Elche, l'humidité de conservation ne semble pas influencer les variations de couleur à 17 °C et 4 °C pendant 8 semaines de conservation. L'hétérogénéité importante entre les lots de grenades semble toutefois indiquer que l'expérience devrait être répétée avec un nombre de grenades plus important pour valider ces observations.

Les grenades Valenciana montrent un changement de couleur de 3,7 la première semaine (n=20) à 15,9 la huitième semaine (n=10) de conservation à température et humidité ambiantes ("S02"), et de 6,0 à 30,2 lorsque l'humidité est contrôlée ("S03"). Les changements de couleur sont significativement différents entre ces deux conditions les semaines 1 et 8 ( $p < 0,05$ ). En chambre froide, la couleur des grenades Valenciana conservées à humidité ambiante ("S04") varie de 2,9 la première semaine à 10,3 la huitième semaine, et de 2,2 à 6,9 sur la même période mais à humidité contrôlée ("S05"). La couleur des grenades conservées dans les deux conditions n'est pas significativement différente ( $p > 0,05$ ) au cours de leur conservation jusqu'à 8 semaines. Par conséquent, l'humidité relative de conservation des grenades Valenciana semble avoir un léger effet sur leur changement de couleur à 17 °C, sans l'affecter à 4 °C. L'augmentation de l'humidité de conservation de 63 à 103 % semble augmenter les variations de couleur les premières et huitièmes semaines de conservation, d'environ 2 la première semaine et 14 la huitième semaine.

L'humidité relative n'influence pas la couleur des grenades Mollar de Elche lorsqu'elles sont placées à 17 °C, alors que certaines semaines de conservation, les grenades Valenciana placées à haute humidité et température ambiante semblent changer plus fortement de couleur. Au cours de la conservation des grenades Wonderful à 20 °C, la composante chromatique  $a^*$  et l'indice chromatique  $C^*$  diminuent quand les grenades sont placées à des humidités relatives de 65 ou 95 %. Le changement de couleur est cependant moins important à plus haute humidité, ce qui a été attribué à l'effet du stress hydrique, altérant les cellules et déclenchant la dégradation des pigments de l'enveloppe du fruit [221] par oxydation. Les péricarpes de grenades contiennent, comme présenté dans les chapitres précédents, une quantité importante de polyphénols qui ont des propriétés antioxydantes importantes. Dans la

partie suivante du chapitre, l'évaluation de la teneur en polyphénols des péricarpes de grenades permettra de déduire si la détérioration de la couleur est bien issue d'un stress oxydant.

#### 4.1.2.b.iii. Effet de la température

L'effet de la température de conservation sur la couleur des grenades peut être évalué *via* la comparaison des conditions "S03", "S05" et "S07", pour lesquelles l'humidité relative a été contrôlée et les grenades placées à 17 °C, 4 °C et 4 °C après une acclimatation à 15 °C pendant 10 jours, respectivement.

Les grenades Mollar de Elche conservées à 17 °C ("S03") ont une couleur variant de 4,0 à 8,3 au cours de leur conservation alors que celles placées à 4 °C ("S05") montrent une évolution de 2,2 à 4,6. Les changements de couleur sont significativement différents ( $p < 0,05$ ) entre ces deux conditions de la deuxième à la troisième semaine de conservation, puis ne sont plus significativement différents jusqu'à la fin de la conservation ( $p > 0,05$ ). A humidité ambiante contrôlée, la baisse de la température de 17 ("S02") à 4,5 °C ("S05") semble limiter le changement de couleur entre les deuxièmes et troisièmes semaines de conservation. L'acclimatation des grenades ("S07") entraîne une variation de leur couleur de 4,5 à 6,1 de la première à la huitième semaine de conservation, qui n'est pas significativement différente de celles des grenades non acclimatées. La température de conservation semble avoir un faible effet sur la couleur des grenades Mollar de Elche, puisque seule l'augmentation de la température de 4 à 17 °C les semaines 2 et 3 semble avoir un effet délétère sur leur couleur.

La conservation des grenades Valenciana à 17 °C ("S03") entraîne un changement de couleur de 4,0 à 8,3 entre les semaines 1 et 8, et de 2,2 à 4,6 sur la même période à 4 °C ("S05"). La température de conservation de 4 °C produit des variations de couleur significativement ( $p < 0,05$ ) plus faibles que 17 °C sur les 8 semaines de conservation. La couleur des grenades ayant été acclimatées avant leur conservation ("S07") varie de 4,5 à 6,1, et aucune différence n'est observée avec les grenades non acclimatées ("S05"). La température de conservation des grenades Valenciana semble avoir un effet sur la couleur des grenades. En particulier, la conservation à 17 °C semble augmenter le changement des grenades pendant 2 mois alors que l'acclimatation à 15 °C ne semble pas affecter leur couleur, comparé aux grenades placées à 4 °C.

La température de conservation de 4 °C semble limiter le changement de couleur des grenades Mollar de Elche et Valenciana par comparaison avec la température ambiante (17 °C), sur une période plus importante pour la seconde. En revanche, acclimater les deux variétés de grenades à 15 °C pendant 10 jours avant leur conservation en chambre froide n'a pas d'effet détectable sur le changement de couleur des fruits. Comme pour la perte de masse des grenades, la température lors de la récolte des grenades est proche de celle employée pour l'acclimatation ce qui pourrait amoindrir l'effet de cette condition de conservation. Dans la littérature un effet semblable a été observé lors de la conservation des grenades Bhagwa et Ruby qui, lorsque la température de conservation diminue de 10 à 5 °C à humidité élevée, changent moins de couleur au cours du temps jusqu'à 8 semaines [368]. Ce phénomène est expliqué par la diminution du développement de micro-organismes liée à une

température plus faible, ainsi qu'un ralentissement des processus biologiques, notamment l'oxydation des pigments présents dans le péricarpe [368]. La grenade est pourtant qualifiée de sensible au froid avec une augmentation du brunissement du fruit à basse température [216,377] qui semblerait donc apparaître en dessous de 4 °C dans le cas des variétés Mollar de Elche et Valenciana.

#### 4.1.2.b.iv. Effet de l'immersion

L'effet de l'immersion des grenades peut être déduit de la comparaison des grenades n'ayant pas été traitées ("S06") avec celles immergées ("S08"- "S13") et conservées à température et humidité relative similaires.

Les grenades Mollar de Elche immergées ("S08"- "S13") montrent un changement de couleur de 1,8-3,3 la première semaine à 8,6-12,6 la huitième semaine, et le lot témoin ("S06") présente une variation de 3,0 à 8,4. Aucune différence significative n'a été détectée entre les couleurs des grenades traitées et non traitées ( $p > 0,05$ ). L'immersion des grenades Mollar de Elche avant leur conservation ne semble donc pas influencer leur changement de couleur pendant 8 semaines.

La couleur des grenades Valenciana évolue de 2,3-3,7 à 11,8-19,4 au cours de leur conservation pendant 8 semaines après immersion ("S08"- "S13"), et de 2,9 à 16,7 pour le lot témoin non immergé ("S06"). L'immersion dans les différentes solutions ne réduit pas significativement le changement de couleur après 8 semaines de conservation. Néanmoins, la deuxième semaine, la variation de couleur des grenades immergées dans une solution de bicarbonate de sodium ("S11") chauffé est plus importante que le témoin non immergé ("S06"), mais le phénomène s'estompe les semaines suivantes. Par conséquent, il semblerait que l'immersion des grenades Valenciana n'influence pas de manière importante leur changement de couleur.

L'immersion des grenades Mollar de Elche et Valenciana dans des solutions chauffées ou non ne semble donc pas impacter leur couleur. L'immersion dans l'eau (froide ou chaude) et les solutions de bicarbonate de sodium ou d'*Aloe vera* froid ne semblent pas influencer la couleur des grenades. L'effet de l'immersion dans l'eau froide ou chaude des grenades Ghoghagh a été évalué par [216] qui ont noté une diminution des altérations, brunissement inclus, de la surface des fruits avec l'eau chaude après 45 et 90 jours de conservation à 4 °C et une humidité relative de 80 %. L'absence de différence entre l'immersion dans l'eau chaude ou froide dans notre étude peut être expliqué par la conservation à une température plus élevée.

#### 4.1.2.b.v. Conditions de conservation optimales

L'influence de trois paramètres de conservation a été étudiée sur la couleur des grenades des deux variétés : la température, l'humidité et l'immersion pré-conservation. Dans l'ensemble, la condition de conservation affecte la couleur de tous les lots de grenades mais cet effet dépend de la méthode et de la durée de conservation. Dans le cas de la variété Mollar de Elche, l'effet de la condition de conservation s'estompe après 4 semaines de conservation, et la couleur des grenades évolue à une intensité similaire entre toutes les conditions.

Une humidité relative élevée semble augmenter le changement de couleur des grenades Valenciana conservées à 17 °C mais n'a pas d'effet sur la variété Mollar de



Elche. La conservation à faible température (4 °C) semble limiter le changement de couleur des deux variétés, bien que Valenciana soit plus touchée. L'immersion des grenades avant leur conservation ne semble pas influencer le changement de couleur. Par conséquent, la conservation à 4 °C semble être la méthode optimale de conservation des grenades, puisque dans cette condition, une humidité non contrôlée n'impactera pas la couleur des grenades. Néanmoins, des essais à plus grande échelle devraient être menés pour valider cette étude préliminaire.

#### 4.1.2.c. Altérations du péricarpe des grenades au cours de leur conservation

Les altérations du péricarpe des grenades ont été évaluées à l'aide des taux d'altérations physiologique ou microbienne, d'éclatement et de craquelure. Ces taux ont été estimés par différence avec le taux initial afin de refléter uniquement l'effet des conditions de conservation. Des exemples de ces altérations sont présentés sur la figure 4.10. Une craquelure a été définie comme la rupture de l'exocarpe des grenades laissant les graines invisibles, alors que l'éclatement correspond à la rupture de l'intégralité du péricarpe rendant les graines visibles.

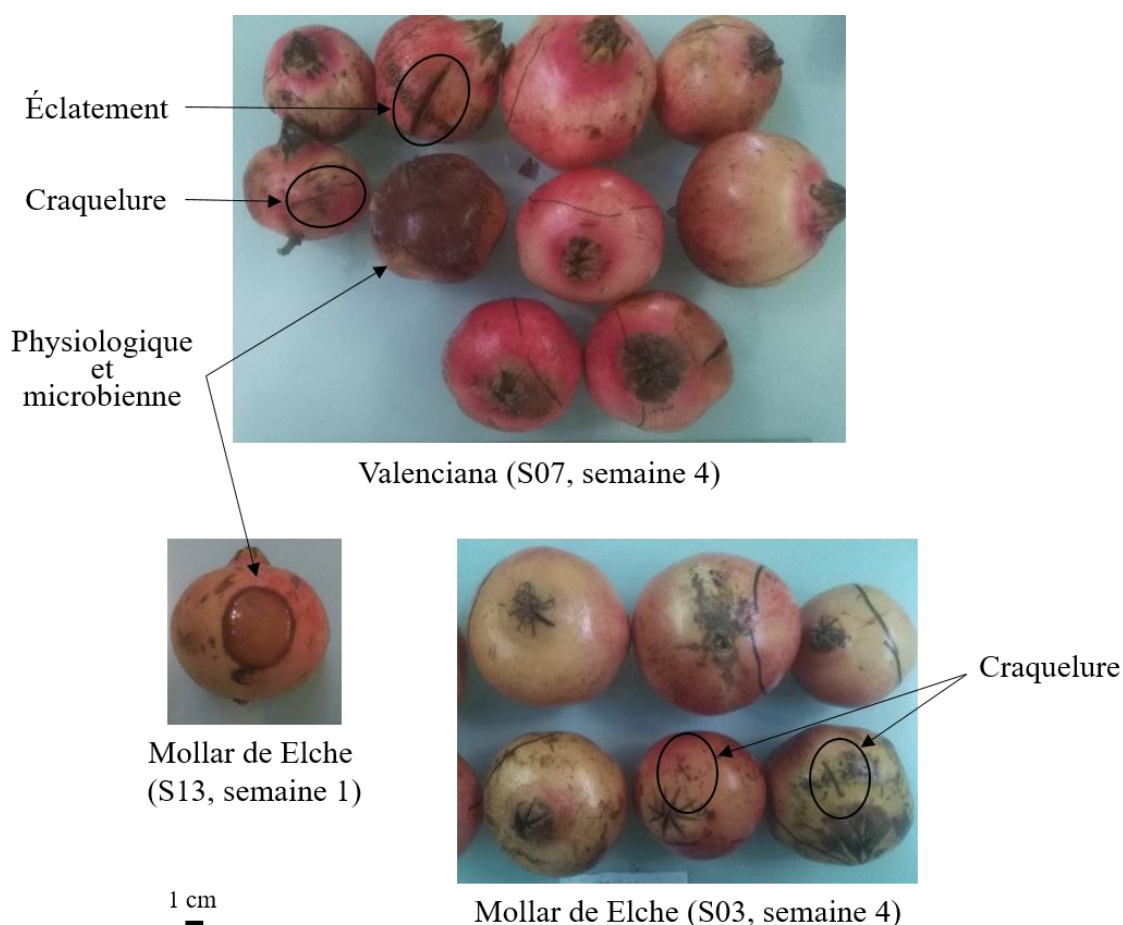


Figure 4.10 : Altérations d'origine physiologique ou microbienne, par craquelure ou par éclatement des grenades Mollar de Elche et Valenciana au cours de leur conservation.

Les taux d'altération du péricarpe, dont la méthode de calcul est spécifiée dans le chapitre 2, ont été obtenus pour chaque lot de grenade dans les 12 conditions au cours

des 8 semaines de conservation (tableau 2.4) à partir de 16 ou 8 grenades pour Mollar de Elche et 20 ou 10 grenades pour Valenciana les quatre premières semaines, puis 8 et 10 grenades pour chaque variété jusqu'à la fin de la période de conservation.

#### 4.1.2.c.i. Altérations physiologique et microbienne

Le taux d'altérations physiologique et microbienne à la surface des grenades (tableau 4.4) a été évalué à l'œil nu par la présence ou l'absence de taches brunes ou de micro-organismes sur chaque fruit d'un lot, c'est-à-dire d'une même condition de conservation. Ce taux résulte d'une seule répétition et représente une étape préliminaire d'évaluation des conditions de conservation concernant l'aspect des grenades.

Les grenades Mollar de Elche semblent présenter des altérations physiologique ou microbienne dès les deux premières semaines dans les conditions "S10", "S11" et "S12", avec des taux variant de 12 à 40 % qui augmentent jusqu'à 50-60 % au cours du temps. Les grenades placées dans les conditions "S05" et "S07" semblent aussi montrer ce type d'altération à partir de la huitième semaine de conservation, ce qui semble négligeable. Pour cette variété, seules les conditions de conservation impliquant l'immersion des grenades semblent engendrer des altérations de l'exocarpe importantes au cours de leur conservation. Pour une durée de conservation inférieure à 8 semaines, toutes les autres conditions semblent être viables.

Les taux d'altération physiologique ou microbienne des grenades Valenciana atteignent 10 % ou plus dès la deuxième semaine puis semblent augmenter jusqu'à 50-80 % après 8 semaines de conservation dans les conditions "S02", "S03", et "S11". Ces conditions semblent entraîner les altérations les plus importantes. Les grenades conservées dans les conditions "S04", "S06", "S08", "S09", "S10" et "S12" présentent des taux d'altération physiologique ou microbienne de 10 % ou moins après 8 semaines. Ces conditions semblent donc les plus favorables pour limiter ces altérations.

Les deux variétés de grenades montrent des altérations physiologique et microbienne pendant leur conservation, qui augmentent au cours du temps. La variété Valenciana semble plus sujette aux désordres physiologiques et au développement de micro-organismes, en raison de ses taux plus élevés dans 4 conditions de plus.

L'augmentation de l'humidité de conservation de 63 ("S02") à 103 % ("S03") à 17 °C ne semble pas avoir d'effet sur la variété Mollar de Elche, alors que la proportion de grenades Valenciana altérées semble augmenter de 30 %. La conservation dans un contenant fermé hermétiquement à 4 °C et à une humidité relative supérieure à 92 % ("S05") semble augmenter le taux d'altérations physiologique et microbienne par rapport aux grenades conservées dans les mêmes conditions avec une circulation d'air plus importante ("S04"), surtout pour la variété Valenciana. En effet, pour Valenciana, ce taux augmente de 0 à 60 % alors que pour Mollar de Elche il augmente de 0 à 12 %, la huitième semaine.

La diminution de la température de conservation de 17 °C ("S03") à 4 °C ("S05") des grenades semble avoir un effet négligeable sur la variété Mollar de Elche alors que la proportion de grenades Valenciana altérées augmente de 60 à 80 %. L'acclimatation

des grenades à 15 °C avant leur conservation à 4 °C (“S07”) ne semble pas impacter le taux d’altérations de Mollar de Elche, mais semble entraîner une diminution du taux d’altérations de Valenciana de 60 à 20 % la huitième semaine, par comparaison aux grenades non acclimatées (“S05”).

L’immersion des grenades avant leur conservation semble affecter les deux variétés de manière nuancée. L’immersion dans de l’eau à 20 °C (“S08”) ou 55 °C (“S09”) ou dans une solution d’*Aloe vera* à 20 °C (“S12”) ne semble pas impacter la proportion de grenades Mollar de Elche altérées, alors que les grenades Valenciana semblent moins détériorées. L’immersion dans une solution de bicarbonate de sodium à 20 °C (“S10”) semble augmenter la proportion de grenades Mollar de Elche altérées alors qu’elle semble limiter les altérations de la variété Valenciana. L’immersion dans la même solution à 55 °C (“S11”) semble accentuer les altérations des deux variétés. L’immersion dans une solution d’*Aloe vera* à 55 °C semble avoir un effet ambivalent sur les deux variétés, avec une augmentation des grenades Mollar de Elche altérées et une proportion équivalente de grenades Valenciana affectées.

Tableau 4.4 : Taux d’altérations d’origine physiologique ou microbienne (%) à la surface des grenades des variétés Mollar de Elche ou Valenciana au cours de leur conservation jusqu’à 8 semaines. Chaque valeur représente le taux observé par lot de 16 ou 8 grenades Mollar de Elche conservées jusqu’à 4 semaines, de 8 grenades Mollar de Elche conservées de 5 à 8 semaines, de 20 ou 10 grenades Valenciana conservées jusqu’à 4 semaines, et de 10 grenades Valenciana conservées de 5 à 8 semaines.

Code condition conservation	Durée conservation (semaine)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Mollar de Elche</b>									
S02	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
S03	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
S04	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
S05	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	12 %
S06	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
S07	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	12 %
S08	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
S09	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
S10	0 %	0-38 %	38 %	38 %	38 %	38 %	38 %	38 %	38 %
S11	0 %	25 %	25-50 %	38-62 %	38-62 %	50 %	50 %	50 %	50 %
S12	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
S13	0 %	0-12 %	12 %	12 %	12 %	12 %	12 %	12 %	12 %
<b>Valenciana</b>									
S02	0 %	0 %	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %	20 %	50 %
S03	0 %	0 %	10 %	20-30 %	30 %	40 %	40 %	70 %	80 %
S04	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
S05	0 %	0 %	0-10 %	0-20 %	0-30 %	0 %	0 %	40 %	60 %
S06	0 %	0 %	0 %	0 %	0-10 %	10 %	10 %	10 %	10 %
S07	0 %	0 %	0-10 %	0-10 %	0-20 %	0 %	0 %	20 %	20 %
S08	0 %	0 %	0 %	0 %	0-10 %	0 %	0 %	0 %	0 %
S09	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
S10	0 %	0 %	0 %	0 %	0-10 %	0 %	0 %	0 %	0 %
S11	0 %	30-50 %	50-70 %	50-70 %	50-70 %	50 %	50 %	50 %	50 %
S12	0 %	0 %	0-10 %	0-10 %	0-10 %	0 %	0 %	0 %	0 %
S13	0 %	0 %	0 %	0-10 %	0-10 %	10 %	10 %	10 %	10 %

Ces essais ont mis en lumière une sensibilité variable à la conservation entre les deux variétés Mollar de Elche et Valenciana, la première semblant plus résistante. L'immersion des grenades dans des solutions de bicarbonate de sodium à 20 ou 55 °C semble entraîner des altérations plus importantes pour les deux variétés, mais la conservation à une température de 17 °C ne semble affecter que Valenciana.

En ce qui concerne les altérations d'origine microbienne, les infections les plus souvent mentionnées dans la littérature, liées à la conservation des grenades ou apparaissant durant cette période, sont de la moisissure grise ou un brunissement causés par le développement de champignons comme *Alternaria* spp., *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* Pers., *Coniella granati*, *Nematospora* spp., *Penicillium* spp. et *Pestalotiopsis versicolor* qui serait plus important entre 5 et 10 °C, et une humidité élevée [29]. L'infection par ces champignons serait en accord avec les observations faites sur la variété Valenciana, pour laquelle la température de conservation de 17 °C semble induire un taux d'altération physiologique ou microbien plus important qu'à 4 °C.

Porat et al. [378] et Larrigaudière et al. [379] ont évalué l'effet du bicarbonate de sodium, de l'eau chaude et de la combinaison des deux sur le développement de moisissures vertes sur le raisin, le citron et la clémentine au cours de leur stockage et ont relevé un effet significatif de tous les traitements d'autant plus important lorsque le bicarbonate de sodium était appliqué chaud. Ce traitement a aussi montré son efficacité sur les moisissures bleues et grises sur la pomme, causées par *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea* [380]. Il semble donc étonnant que dans notre cas, l'immersion des grenades dans une solution de bicarbonate de sodium chauffé promeuve le développement de micro-organismes à la surface des fruits, et cette solution serait plutôt potentiellement à l'origine d'altérations liées à un phénomène physiologique.

Pour affiner et valider les observations des altérations physiologique ou microbienne des grenades, ces expériences devraient être réitérées avec plusieurs lots de grenades et sur plusieurs années, pour retirer les biais potentiels et ainsi augmenter leur fiabilité. Lors de ces essais, l'identification et la quantification des micro-organismes ainsi que l'évaluation des phénomènes physiologiques potentiellement impliqués permettrait d'écarter une contamination ou un facteur incontrôlé.

#### 4.1.2.c.ii. Altérations physiques par craquelure

L'altération de l'aspect externe des grenades évalué par observation de la présence de craquelures à la surface des fruits est présenté sur le tableau 4.5.

Le taux de craquelures des grenades Mollar de Elche semble rester constant à 0 % dans toutes les conditions de conservation, excepté la condition "S03" (17 °C et 63 % d'humidité) et la condition "S07" (4 °C après acclimatation, et humidité relative supérieure à 92 %). Dans ces conditions, la proportion de grenades craquelées semble inférieure ou égale à 12 %, ce qui semble négligeable.

Les grenades Valenciana conservées montrent des taux de craquelure beaucoup plus importants, jusqu'à 50 % des fruits après 8 semaines de conservation. Ce taux augmente au cours des 8 semaines dans toutes les conditions, à l'exception des



Code condition conservation	Durée conservation (semaine)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Valenciana</b>									
S02	0 %	0 %	0-20 %	0-20 %	0-20 %	20 %	20 %	20 %	20 %
S03	0 %	0-20 %	0-30 %	0-30 %	10-30 %	10 %	30 %	30 %	30 %
S04	0 %	0 %	0 %	0-10 %	0-10 %	0 %	0 %	0 %	0 %
S05	0 %	0 %	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %
S06	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
S07	0 %	0-10 %	0-10 %	0-10 %	0-10 %	0 %	0 %	0 %	0 %
S08	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
S09	0 %	0 %	0-10 %	0-10 %	0-10 %	10 %	10 %	10 %	10 %
S10	0 %	0 %	0-10 %	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %
S11	0 %	0-10 %	0-10 %	0-10 %	0-10 %	10 %	10 %	10 %	10 %
S12	0 %	0 %	10-30 %	10-40 %	10-40 %	40 %	40 %	40 %	50 %
S13	0 %	0 %	0-10 %	0-20 %	0-20 %	20 %	20 %	20 %	20 %

#### 4.1.2.c.iii. Altérations physiques par éclatement

Le taux d'éclatement des grenades est présenté sur le tableau 4.6 pour chacune des variétés au cours de leur conservation jusqu'à 8 semaines.

Les grenades Mollar de Elche ont un taux d'éclatement de 0 % au cours de leur conservation dans les 12 conditions testées. Ces conditions ne semblent donc pas affecter l'éclatement des grenades de cette variété.

En revanche, après 8 semaines de conservation, les grenades Valenciana montrent entre 10 et 30 % d'éclatement dans la plupart des conditions à l'exception des conditions "S06", "S08", "S09" et "S10", c'est-à-dire lorsqu'elles sont placées à 7 °C et 80 % d'humidité après avoir été immergées, ou non ("S06"), dans de l'eau à 20 °C ("S08") ou 55 °C ("S09") ou dans du bicarbonate de sodium à 20 °C ("S10"). Les proportions de grenades éclatées semblent être les plus importantes dans les conditions "S02", "S03" et "S11", avec un taux atteignant 20 à 30 %. Ces conditions sont aussi celles pour lesquelles la proportion de fruits atteints par des dégradations physiologique ou microbienne sont les plus importantes. Cela suggère que les altérations physiologiques ou microbiennes pourraient être à l'origine de l'éclatement des grenades, ce qui est cohérent avec une altération du péricarpe conduisant à sa rupture pendant la conservation.

Comme pour les craquelures à la surface des grenades, l'éclatement au cours de la conservation des grenades semble avoir un effet variable selon la variété considérée, Mollar de Elche n'y étant pas visiblement sensible. Les grenades Valenciana semblent affectées par certaines conditions à hauteur de 10 à 30 % d'entre elles, en particulier lorsqu'elles sont placées à température ambiante et humidité relative ambiante ("S02") ou élevée ("S03") et à 7 °C et 80 % d'humidité après avoir été plongées dans une solution de bicarbonate de sodium à 55 °C.

Tableau 4.6 : Taux d'altérations par éclatement (%) de la surface des grenades des variétés Mollar de Elche ou Valenciana au cours de leur conservation jusqu'à 8 semaines. Chaque valeur représente le taux observé par lot de 16 ou 8 grenades Mollar de Elche conservées jusqu'à 4 semaines, de 8 grenades Mollar de Elche conservées de 5 à 8 semaines, de 20 ou 10 grenades Valenciana conservées jusqu'à 4 semaines, et de 10 grenades Valenciana conservées de 5 à 8 semaines.

Code condition conservation	Durée conservation (semaine)									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
<b>Mollar de Elche</b>										
S02	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
S03	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
S04	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
S05	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
S06	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
S07	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
S08	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
S09	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
S10	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
S11	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
S12	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
S13	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
<b>Valenciana</b>										
S02	0 %	0 %	0-20 %	10-20 %	10-20 %	20 %	20 %	30 %	30 %	
S03	0 %	0-20 %	0-20 %	0-30 %	0-30 %	0 %	20 %	20 %	20 %	
S04	0 %	0 %	0 %	0-20 %	10-20 %	10 %	10 %	10 %	10 %	
S05	0 %	0 %	0 %	0-10 %	0-10 %	10 %	10 %	10 %	10 %	
S06	0 %	0 %	0-10 %	0-10 %	0-10 %	0 %	0 %	0 %	0 %	
S07	0 %	0-10 %	0-10 %	0-10 %	0-10 %	0 %	0 %	10 %	10 %	
S08	0 %	0 %	0-10 %	0-10 %	0-10 %	0 %	0 %	0 %	0 %	
S09	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	
S10	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	
S11	0 %	0 %	0 %	0-10 %	0-10 %	10 %	20 %	20 %	20 %	
S12	0 %	0 %	0 %	0-10 %	0-10 %	10 %	10 %	10 %	10 %	
S13	0 %	0 %	0-10 %	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %	10 %	

### 4.1.3. Conclusion

L'étude qualitative des grenades Mollar de Elche et Valenciana au cours de leur conservation a montré que leur masse diminue ou reste stable, leur couleur s'éloigne de la couleur initiale, et des altérations du péricarpe (physiologiques, micro-organismes, craquelures ou fissures) peuvent se développer à leur surface. Chaque variété a sa propre sensibilité aux 12 conditions de conservation étudiées, bien que des tendances générales puissent être dégagées.

La perte de masse des grenades au cours du temps a été attribuée principalement à leur déshydratation liée au taux d'humidité de leur environnement et aux pores présents à leur surface. Le changement de couleur est un brunissement qui serait accentué par des températures élevées et une humidité élevée pour la variété Valenciana, et pourrait résulter de la dégradation des pigments présents dans l'exocarpe des grenades,

d'altérations liées à des phénomènes physiologiques ou au développement de micro-organismes à leur surface. Les taux d'altérations du péricarpe ont été obtenus à partir d'une seule répétition d'expérience avec un nombre de grenades limitées, et nécessitent une étude plus approfondie au vu des résultats. En effet, les altérations physiologique ou microbienne semblent liées à l'immersion dans du bicarbonate de sodium et à une humidité ambiante élevée, et pourraient aussi être liées à l'éclatement des grenades. Le taux de craquelure des grenades semble indiquer que le péricarpe des grenades Mollar de Elche est plus résistant que celui de Valenciana, qui semble se détériorer principalement par la conservation à température ambiante et humidité supérieure à 92 %.

Les conditions les plus favorables au maintien de la masse des grenades des deux variétés sont l'humidité élevée, une température de 4 °C, et l'immersion dans de l'eau chaude, du bicarbonate de sodium à température ambiante, ou de l'*Aloe vera* à température ambiante. En ce qui concerne la couleur des grenades, elle semble se maintenir à une température de 4 °C et humidité relative élevée, et l'immersion dans de l'eau à température ambiante ou chauffée, du bicarbonate de sodium à température ambiante ou de l'*Aloe vera* à température ambiante ne semblent pas avoir d'effet. Les altérations physiologique et microbienne à la surface des grenades des deux variétés semblent être importantes pour les grenades plongées dans une solution de bicarbonate de sodium, ou conservées à humidité relative élevée dans un contenant hermétique à 17 °C ou 4 °C. L'altération physique par craquelure ou éclatement du péricarpe des grenades semble survenir principalement pour les grenades Valenciana, notamment par la combinaison d'une température de 17 °C avec une humidité élevée.

Les conditions permettant donc de maintenir la qualité des grenades au cours de leur conservation semblent donc être une température de 4 °C, avec ou sans acclimatation à 15 °C pendant 10 jours, une humidité relative élevée et une circulation d'air, ainsi que l'immersion au préalable dans de l'eau froide (20 °C) ou chaude (55 °C) contenant du bicarbonate de sodium ou non. Toutefois, la conservation des grenades pourrait aussi affecter leur composition chimique. La caractérisation en polyphénols des péricarpes et en lipides des co-produits de pressage des graines sera abordée dans la partie suivante.

## **4.2. Influence des conditions de conservation des grenades sur les teneurs en composés à valeur ajoutée des co-produits de transformation des grenades**

Les grenades Mollar de Elche et Valenciana ont été échantillonnées en co-produits après 0, 4 et 8 semaines de conservation. Les lots de co-produits ont été obtenus à partir de 10 grenades pour les lots non conservés des deux variétés et la variété Valenciana, et à partir de 8 fruits pour la variété Mollar de Elche. Les différents lots de co-produits ainsi formés ont été donnés au début du chapitre dans le tableau 2.5. Les composés à valeur ajoutée présents dans ces co-produits sont les polyphénols et les lipides des péricarpes et co-produits de pressage des graines, respectivement. Les composés de ces deux familles ont été identifiés et quantifiés dans le but de déterminer l'impact des conditions de conservation sur leurs teneurs. Dans un premier temps seront développés les résultats relatifs à la caractérisation des péricarpes de grenades,



puis dans un second temps ceux liés à la composition des co-produits de pressage. Dans chacune de ces parties, la composition des co-produits des grenades non conservée (0 semaine) sera exposée avant de présenter l'évolution des teneurs au cours de la conservation puis la comparaison des 12 conditions de conservation.

## 4.2.1. Influence des conditions de conservation des grenades sur les polyphénols des péricarpes

### 4.2.1.a. Teneurs en polyphénols des péricarpes des grenades avant leur conservation

La composition des péricarpes de grenades des variétés Mollar de Elche et Valenciana avant leur conservation (0 semaine) est donnée dans le tableau 4.7. Comme pour les co-produits de grenades issues des itinéraires de culture étudiés précédemment, la composition chimique des co-produits a été évaluée avec le rendement en extractibles au méthanol (g/100g ms), la teneur en polyphénols totaux (mg eag/g ms) et les teneurs en ellagitannins ciblés (punicalagine, punicaline et acide ellagique, mg/g ms).

Tableau 4.7 : Composition des péricarpes de grenades Mollar de Elche et Valenciana avant leur conservation (n=10 fruits). Les valeurs moyennes sont données pour chaque lot de co-produits des variétés Mollar de Elche et Valenciana non conservées.

Variété	Durée conservation (semaine)	Rendement extrait méthanol (g/100g ms)	Polyphénols totaux (mg eag/g ms)	Punicalagine (mg/g ms)	Punicaline (mg/g ms)	Acide ellagique (mg/g ms)
Mollar de Elche	0	58 ± 1	163,5 ± 6,0	66,6 ± 1,5	0,8 ± 0,0	3,1 ± 0,0
Valenciana	0	56 ± 1	129,7 ± 3,0	43,3 ± 8,0	1,0 ± 0,2	5,3 ± 0,2
p	0	0,085	0,001	0,008	0,16	<0,0001
p cor.(H)	0	0,598	0,014	0,098	0,62	0,001

Les valeurs sont les moyennes ± écart-type de l'analyse de trois échantillons. La significativité de la différence entre variétés est donnée par la p-valeur d'une analyse de la variance (seuil 5 %), puis ajustée avec la correction de Holm (p cor. (H)).

Le rendement en extractibles au méthanol est de 58 et 56 % pour Mollar de Elche et Valenciana, respectivement, et n'est pas significativement différent ( $p > 0,05$ ) entre les deux variétés. Par conséquent, les péricarpes des grenades Mollar de Elche et Valenciana contiennent une teneur similaire en extractibles au méthanol d'environ 56-58 %. Ces valeurs sont en accord avec les rendements décrits dans le chapitre précédent, entre 44 et 65 %, et dans la littérature, entre 11 et 47 % [127,167,263,264,304,305]. Plus spécifiquement, la variété Mollar de Elche a montré un rendement compris entre 44 et 56 % ce qui est aussi cohérent avec ces résultats.

La teneur en polyphénols totaux est significativement ( $p < 0,05$ ) plus élevée dans les péricarpes de la variété Mollar de Elche (163 mg eag/g ms) que dans ceux de la variété Valenciana (130 mg eag/g ms). Ces écarts entre variétés sont cohérents avec l'étude de l'effet de la variété de grenade sur la teneur en polyphénols totaux présentée dans le chapitre précédent. Cela implique que l'effet de la conservation des grenades sur ces composés doit être évalué de manière séparée entre les deux variétés.

La teneur en polyphénols totaux relevée pour la variété Mollar de Elche (163 mg eag/g ms) se situe dans l'intervalle observé dans le chapitre précédent, de 148-311 mg eag/g ms. Celle des péricarpes de Valenciana a été évaluée dans la littérature à 680 - 983 mg eag pour 100 mg d'extrait [381] alors que les extraits méthanoliques présentés ci-dessus ont une teneur de 23 mg eag pour 100 mg d'extrait. Comme décrit dans le chapitre précédent, ces différences peuvent résulter de l'origine et des méthodes de culture des grenades, puisque celles employées dans l'étude de Shimizu et al. [381] proviennent du Brésil, ou bien de facteurs expérimentaux comme l'extraction à l'eau à 105 °C au lieu du méthanol à 20 °C dans notre cas.

Les péricarpes des grenades Mollar de Elche et Valenciana contiennent des teneurs en punicalagine de 67 et 43 mg/g ms, et en punicaline de 0,8 et 1,0 mg/g ms, respectivement. Ces teneurs ne sont pas significativement différentes ( $p > 0,05$ ) entre les deux variétés. L'absence de différence des teneurs en punicalagine semble due à une forte variabilité de celle des péricarpes de Valenciana. Concernant l'acide ellagique, la teneur des péricarpes de Valenciana est de 5,5 mg/g ms alors que celle de la variété Mollar de Elche est de 5,3 mg/g ms. Valenciana contient significativement plus d'acide ellagique que Mollar de Elche.

Pour les deux variétés, la punicalagine semble être l'ellagitannin majoritaire des péricarpes de grenades, ce qui rejoint les observations faites dans le chapitre précédent et la littérature [228]. Les teneurs en punicalagine et acide ellagique des péricarpes de la variété Mollar de Elche sont cohérentes avec celles décrites précédemment (2,3-3,7 et 73-207 mg/g ms, pour l'acide ellagique et la punicalagine, respectivement) et dans la littérature (1,7 et 212 mg/g ms, pour l'acide ellagique et la punicalagine, respectivement). Il en est de même pour la teneur en punicaline, comprise entre 0,9 et 1,2 mg/g ms dans les péricarpes de grenades présentés précédemment (chapitre 3).

Les péricarpes des grenades des variétés Mollar de Elche et Valenciana ont un rendement en extractible et des teneurs en punicalagine et punicaline semblant similaires, en moyenne de 57 %, 55 et 0,9 mg/g ms, respectivement. La variété Mollar de Elche semble contenir une plus haute teneur en polyphénols totaux (25 % de plus que Valenciana), alors que Valenciana semble contenir plus d'acide ellagique (75 % de plus que Mollar de Elche). La composition chimique des péricarpes des deux variétés est en accord avec les résultats présentés précédemment (chapitre 3) et les données de la littérature, et notamment, la punicalagine semble être l'ellagitannin prédominant dans les co-produits.

Les teneurs en polyphénols des péricarpes des grenades non conservées constituent le point de départ de l'étude de l'évolution de la composition des péricarpes au cours de la conservation des grenades. Les différences existantes entre les deux variétés impliquent que cette évolution devra potentiellement être étudiée pour chaque variété séparément.

#### **4.2.1.b. Teneurs en polyphénols des péricarpes au cours de la conservation des grenades**

La composition chimique des péricarpes des grenades Mollar de Elche et Valenciana avant et après leur conservation pendant 4 ou 8 semaines est présentée dans le tableau 4.8.

Le rendement en extractibles au méthanol des péricarpes de grenades Mollar de Elche est compris entre 40 et 58 %, et celui de la variété Valenciana entre 45 et 56 %. Pour les deux variétés, ce rendement semble plus élevé avant la conservation des grenades. La teneur en polyphénols totaux est comprise entre 116 et 189 mg eag/g ms dans les péricarpes des grenades Mollar de Elche, et entre 77 et 143 mg eag/g ms pour Valenciana. Les teneurs en punicalagine, punicaline et acide ellagique sont de 51-89, 0,6-1,5, 2,3-4,2 mg/g ms dans les péricarpes des grenades Mollar de Elche et de 19-85, 0,4-9,8, 3,0-14,1 mg/g ms pour Valenciana.

Pour les deux variétés de grenades, tous les composés quantifiés sont significativement différents ( $p < 0,05$ ) entre au moins deux échantillons. Par conséquent, le rendement en extractibles au méthanol ainsi que les teneurs en polyphénols totaux, punicalagine, punicaline et acide ellagique sont au moins différents entre deux conditions de conservation. Pour identifier les échantillons présentant les teneurs maximales en polyphénols ainsi que l'importance de la variété, une étude préliminaire par analyse multivariée a été conduite.

Tableau 4.8 : Composition des péricarpes au cours de la conservation des grenades.

Code conservation	Durée cons. (semaine)	Type im.	T im. (°C)	T cons. (°C)	RH cons. (%)	Rendement extrait (g/100g ms)	Polyphénols totaux (mg eag/g ms)	Punicalagine (mg/g ms)	Punicaline (mg/g ms)	Acide ellagique (mg/g ms)	
<b>Mollar de Elche</b>											
S01	0	-	-			58 ± 1	163,5 ± 6,0	66,6 ± 1,5	0,8 ± 0,0	3,1 ± 0,0	
S02	4	-	-	17	63	49 ± 3	165,2 ± 5,4	64,7 ± 2,9	0,8 ± 0,0	3,6 ± 0,0	
	8	-	-	17	63	46 ± 1	164,6 ± 2,6	69,4 ± 2,0	1,3 ± 0,0	3,6 ± 0,1	
S03	4	-	-	17,1	103	55 ± 1	163,0 ± 0,4	88,5 ± 1,4	1,1 ± 0,0	3,6 ± 0,0	
	8	-	-	17,1	103	51 ± 0	170,5 ± 4,2	76,2 ± 1,6	1,5 ± 0,0	4,1 ± 0,1	
S04	4	-	-	3,7	97	52 ± 1	166,2 ± 4,5	75,3 ± 2,8	1,1 ± 0,3	2,9 ± 0,1	
	8	-	-	3,7	97	46 ± 1	180,4 ± 6,6	86,8 ± 1,9	1,1 ± 0,0	2,6 ± 0,0	
S05	4	-	-	4,3	103	53 ± 1	176,6 ± 1,7	75,8 ± 1,7	0,8 ± 0,0	2,4 ± 0,0	
	8	-	-	4,3	103	50 ± 1	167,4 ± 6,3	68,9 ± 2,0	0,7 ± 0,0	4,0 ± 0,0	
S06	4	-	-	7,1	77	41 ± 2	172,6 ± 3,2	75,2 ± 1,0	1,0 ± 0,0	3,7 ± 1,0	
	8	-	-	7,1	77	40 ± 1	162,4 ± 7,7	67,6 ± 3,3	0,8 ± 0,0	2,4 ± 0,1	
S07	4	-	-	15,1 puis 4,1	99 puis 104	45 ± 1	188,8 ± 2,6	82,1 ± 3,6	1,1 ± 0,2	2,4 ± 0,0	
	8	-	-	15,1 puis 4,1	99 puis 104	46 ± 1	169,5 ± 7,2	70,4 ± 1,7	0,8 ± 0,0	3,4 ± 0,1	
S08	4	eau	20°C	7,1	77	45 ± 2	179,6 ± 3,1	76,3 ± 1,9	1,1 ± 0,0	3,7 ± 0,0	
	8	eau	20°C	7,1	77	42 ± 1	155,7 ± 2,5	67,0 ± 2,3	0,8 ± 0,0	3,2 ± 0,1	
S09	4	eau	55°C	7,1	77	43 ± 0	151,6 ± 2,1	64,5 ± 1,8	0,8 ± 0,0	3,4 ± 0,0	
	8	eau	55°C	7,1	77	42 ± 1	143,1 ± 6,7	63,5 ± 3,3	0,8 ± 0,0	3,0 ± 0,1	
S10	4	NaHCO <sub>3</sub>	20°C	7,1	77	47 ± 2	148,9 ± 5,7	60,9 ± 1,6	0,7 ± 0,0	3,0 ± 0,0	
	8	NaHCO <sub>3</sub>	20°C	7,1	77	45 ± 1	153,8 ± 2,9	61,8 ± 0,4	0,9 ± 0,0	3,2 ± 0,0	
S11	4	NaHCO <sub>3</sub>	55°C	7,1	77	44 ± 3	174,1 ± 4,0	66,5 ± 0,5	0,8 ± 0,0	3,3 ± 0,0	
	8	NaHCO <sub>3</sub>	55°C	7,1	77	43 ± 2	158,3 ± 6,2	70,7 ± 2,0	0,9 ± 0,0	2,9 ± 0,0	
S12	4	<i>Aloe vera</i>	20°C	7,1	77	46 ± 3	181,2 ± 10,4	83,7 ± 2,1	1,1 ± 0,0	3,2 ± 0,1	
	8	<i>Aloe vera</i>	20°C	7,1	77	44 ± 2	143,8 ± 5,0	58,9 ± 1,0	0,8 ± 0,0	2,7 ± 0,0	
S13	4	<i>Aloe vera</i>	55°C	7,1	77	49 ± 0	116,0 ± 1,4	51,0 ± 0,2	0,6 ± 0,0	2,3 ± 0,0	
	8	<i>Aloe vera</i>	55°C	7,1	77	42 ± 2	133,7 ± 8,5	57,3 ± 2,3	0,8 ± 0,0	2,7 ± 0,1	
						p	3,1e-21	1,3e-21	5,0e-29	4,5e-20	6,1e-17
						p cor.(H)	4,1e-20	1,8e-20	8,1e-28	5,4e-19	5,5e-16

Les valeurs sont les moyennes ± écart-type de l'analyse de trois échantillons. La significativité de la différence entre variétés est donnée par la p-valeur d'une analyse de la variance (p), puis ajustée avec la correction de Holm (p cor. (H)).  
T : température, RH : humidité relative, im. : immersion, cons. : conservation, eau : eau distillée, NaHCO<sub>3</sub> : bicarbonate de sodium 10 g/L, *Aloe vera* 1 g/L

Tableau 4.8, suite.

Code conservation	Durée cons. (semaine)	Type im.	T im. (°C)	T cons. (°C)	RH cons. (%)	Rendement extrait (g/100g ms)	Polyphénols totaux (mg eag/g ms)	Punicalagine (mg/g ms)	Punicaline (mg/g ms)	Acide ellagique (mg/g ms)	
<b>Valenciana</b>											
S01	0	-	-			56 ± 1	129,7 ± 3,0	43,3 ± 8,0	1,0 ± 0,2	5,3 ± 0,2	
S02	4	-	-	17	63	52 ± 1	99,3 ± 4,2	46,1 ± 0,2	3,4 ± 1,2	5,8 ± 0,2	
	8	-	-	17	63	48 ± 1	85,9 ± 4,8	40,4 ± 1,3	2,7 ± 0,3	5,6 ± 0,2	
S03	4	-	-	17,1	103	57 ± 1	106,0 ± 3,0	40,0 ± 4,9	2,8 ± 0,2	7,5 ± 0,3	
	8	-	-	17,1	103	47 ± 1	77,0 ± 4,5	19,1 ± 6,6	9,8 ± 2,8	14,1 ± 0,5	
S04	4	-	-	3,7	97	55 ± 0	142,7 ± 7,7	65,3 ± 2,9	1,0 ± 0,1	4,2 ± 0,1	
	8	-	-	3,7	97	52 ± 2	136,4 ± 1,3	36,5 ± 0,8	0,8 ± 0,0	4,4 ± 0,1	
S05	4	-	-	4,3	103	56 ± 1	113,6 ± 1,7	26,8 ± 1,2	1,0 ± 0,0	5,3 ± 0,3	
	8	-	-	4,3	103	53 ± 1	131,8 ± 3,7	33,7 ± 1,0	0,7 ± 0,0	4,2 ± 0,0	
S06	4	-	-	7,1	77	47 ± 1	97,6 ± 2,9	27,7 ± 0,6	0,7 ± 0,0	4,3 ± 0,0	
	8	-	-	7,1	77	48 ± 1	94,6 ± 2,3	25,7 ± 0,9	0,9 ± 0,0	4,5 ± 0,1	
S07	4	-	-	15,1 puis 4,1	99 puis 104	57 ± 1	128,0 ± 7,2	35,1 ± 2,2	0,7 ± 0,0	3,7 ± 0,1	
	8	-	-	15,1 puis 4,1	99 puis 104	49 ± 1	107,5 ± 3,3	31,8 ± 0,8	1,0 ± 0,0	4,7 ± 0,1	
S08	4	eau	20°C	7,1	77	54 ± 1	74,5 ± 3,7	38,4 ± 1,0	0,7 ± 0,0	3,9 ± 0,0	
	8	eau	20°C	7,1	77	49 ± 1	109,4 ± 3,6	65,4 ± 0,5	0,7 ± 0,0	3,7 ± 0,0	
S09	4	eau	55°C	7,1	77	55 ± 1	121,5 ± 0,7	68,6 ± 2,5	0,7 ± 0,0	4,2 ± 0,1	
	8	eau	55°C	7,1	77	45 ± 2	100,2 ± 1,4	54,9 ± 4,0	0,6 ± 0,0	3,7 ± 0,1	
S10	4	NaHCO <sub>3</sub>	20°C	7,1	77	59 ± 1	91,0 ± 3,9	41,6 ± 1,9	0,4 ± 0,0	3,0 ± 0,0	
	8	NaHCO <sub>3</sub>	20°C	7,1	77	48 ± 2	128,1 ± 5,4	84,8 ± 3,4	0,6 ± 0,0	3,8 ± 0,1	
S11	4	NaHCO <sub>3</sub>	55°C	7,1	77	57 ± 1	96,8 ± 1,3	49,4 ± 2,4	0,4 ± 0,0	3,4 ± 0,2	
	8	NaHCO <sub>3</sub>	55°C	7,1	77	53 ± 0	88,3 ± 2,6	50,6 ± 0,5	0,6 ± 0,0	3,4 ± 0,1	
S12	4	<i>Aloe vera</i>	20°C	7,1	77	58 ± 1	107,3 ± 4,5	52,0 ± 2,3	0,4 ± 0,0	3,4 ± 0,0	
	8	<i>Aloe vera</i>	20°C	7,1	77	49 ± 1	94,1 ± 1,7	50,1 ± 1,8	0,7 ± 0,0	3,9 ± 0,1	
S13	4	<i>Aloe vera</i>	55°C	7,1	77	50 ± 3	112,8 ± 6,0	64,8 ± 2,4	0,5 ± 0,0	3,5 ± 0,0	
	8	<i>Aloe vera</i>	55°C	7,1	77	48 ± 1	103,7 ± 3,8	65,8 ± 2,0	0,7 ± 0,0	4,0 ± 0,1	
						p	6,3e-23	7,7e-30	2,7e-33	2,0e-21	1,6e-52
						p cor.(H)	9,4e-22	1,3e-28	5,2e-32	2,6e-20	3,2e-51

Les valeurs sont les moyennes ± écart-type de l'analyse de trois échantillons. La significativité de la différence entre variétés est donnée par la p-valeur d'une analyse de la variance (p), puis ajustée avec la correction de Holm (p cor. (H)). T : température, RH : humidité relative, im. : immersion, cons. : conservation, eau : eau distillée, NaHCO<sub>3</sub> : bicarbonate de sodium 10 g/L, *Aloe vera* 1 g/L

#### 4.2.1.c. Étude préliminaire de la composition des péricarpes de grenades Mollar de Elche et Valenciana pendant leur conservation par analyse multivariée

Une analyse en composantes principales (ACP) a été menée avec la composition chimique des péricarpes des grenades Mollar de Elche et Valenciana, conservées de 4 à 8 semaines dans les 12 conditions et non conservées. Par conséquent, les quatre variables étudiées sont le rendement en extractibles au méthanol (rdt\_meoh) ainsi que les teneurs en polyphénols totaux (polyphenols.totaux), punicalagine, punicaline et acide ellagique (a.ellagique). Les trois facteurs étudiés sont la variété de grenade, la condition de conservation et la durée de conservation.

D'après le tableau 4.9, les deux composantes PC1 et PC2 représentent bien les différences de composition des lots de co-produits avec une variance expliquée de 53,9 et 25,7 % respectivement, c'est-à-dire plus de trois quart (79,6 %) de la variabilité entre les échantillons.

La composante PC1 représente principalement les variations entre les échantillons liées aux teneurs en polyphénols ( $r > 0,65$  et  $p < 0,05$ ) alors que la composante PC2 décrit les différences liées au rendement en extractibles et à la teneur en punicaline ( $r > 0,65$  et  $p < 0,05$ ).

Tableau 4.9 : Variables (composition chimique) et facteurs interprétables (variété, condition et durée de conservation) de l'analyse en composante principale des échantillons de péricarpes des grenades Mollar de Elche et Valenciana conservées. Les variables et facteurs interprétables sur chaque composante sélectionnée (PC1 et PC2) sont mis en évidence en gras.

Variable	Code variable	PC1 (53,9 %)	p (PC1)	PC2 (25,7 %)	p (PC2)
Rendement extrait (g/100g ms)	rdt_meoh	0,38	<0,0001	<b>-0,65</b>	<b>&lt;0,0001</b>
Polyphénols totaux (mg eag/g ms)	polyphenols.totaux	<b>-0,78</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,41	<0,0001
Punicalagine (mg/g ms)	punicalagine	<b>-0,82</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,31	<0,0001
Punicaline (mg/g ms)	punicaline	<b>0,71</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,65</b>	<b>&lt;0,0001</b>
Acide ellagique (mg/g ms)	a.ellagique	<b>0,87</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,41	<0,0001
<b>Facteur étudié</b>					
Variété			<b>&lt;0,0001</b>		<b>&lt;0,0001</b>
Condition conservation			<b>0,004</b>		<b>0,0019</b>
Durée conservation (semaine)			0,8192		<b>0,0014</b>

Les relations entre les variables, c'est-à-dire entre les composants des péricarpes de grenades, sont présentées sur la figure 4.11. Les teneurs en polyphénols totaux (polyphenols.totaux) et punicalagine, ainsi que celles en punicaline et acide ellagique (a.ellagique) semblent corrélées positivement entre-elles, alors que le rendement en extractible (rdt\_meoh) paraît indépendant.

Cela suggère que les évolutions des teneurs en polyphénols totaux et punicalagine, ou en punicaline et acide ellagique sont semblables entre les échantillons, alors que celle du rendement en extractibles pourrait suivre une autre tendance.

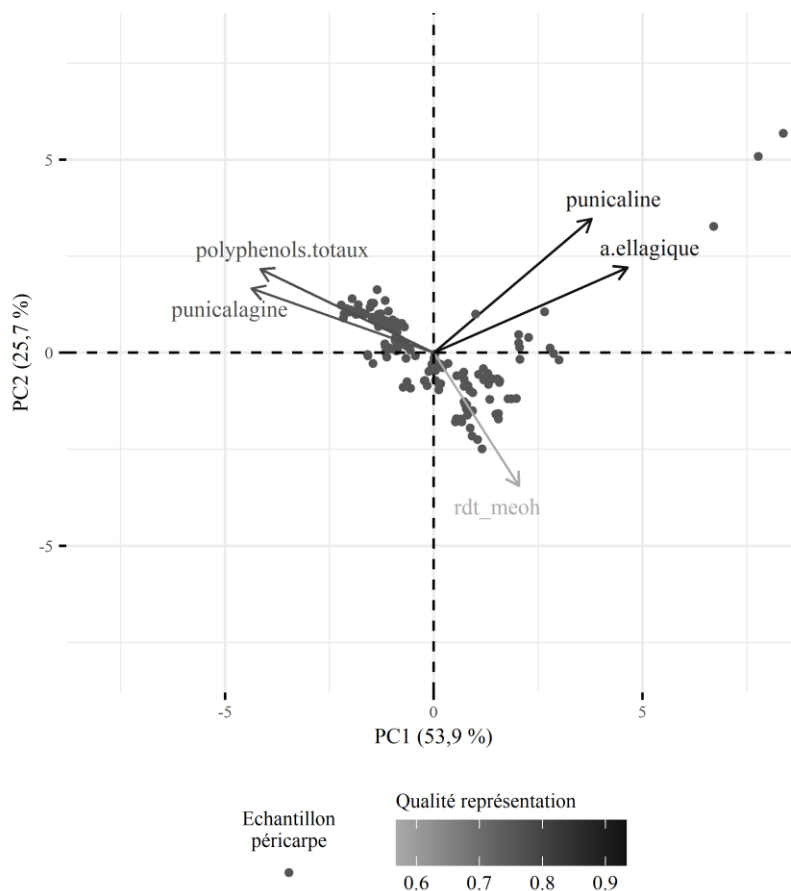


Figure 4.11 : Relations entre le rendement d'extraction et les teneurs en polyphénols totaux, punicalagine, punicaline et acide ellagique des péricarpes des grenades. Représentation sur les plans formés par les composantes PC1 et PC2 des individus (50 échantillons, 3 répétitions) et de leurs variables (composés). La qualité de la représentation des composés (vecteurs) sur les plans est donnée par un indice croissant de gris à noir.

Comme précisé précédemment, l'écart entre les compositions chimiques des deux variétés avant leur conservation implique l'évaluation de l'effet de la variété sur la composition des péricarpes avant d'établir celui de la conservation des grenades.

Parmi les facteurs étudiés choisis pour l'ACP (tableau 4.9), la variété induit une différence significative entre les échantillons sur les composantes PC1 et PC2 ( $p(\text{PC1})$  et  $p(\text{PC2}) < 0,05$ ) qui semble beaucoup plus importante que celles de la durée et de la condition de conservation. Par conséquent, les variations des teneurs en composés entre les échantillons de péricarpes de grenades conservées seraient liées principalement à la variété.

Les échantillons de péricarpe sont représentés par variété sur la figure 4.12.

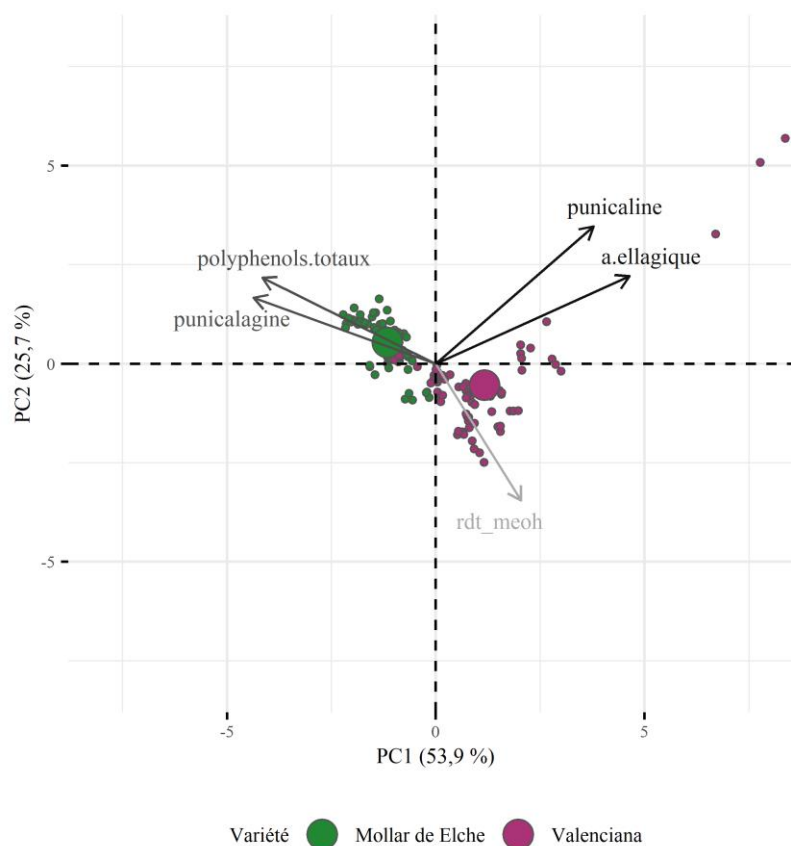


Figure 4.12 : Comparaison du rendement d'extraction et des teneurs en polyphénols totaux, punicalagine, punicaline et acide ellagique des péricarpes des grenades des variétés Mollar de Elche et Valenciana. Représentation sur les plans formés par les composantes PC1 et PC2 des individus (points), de leurs barycentres et de leurs variables (composés). La qualité de la représentation des composés (vecteurs) sur les plans est donnée par un indice croissant de gris à noir, et la variété est représentée en couleur, vert pour Mollar de Elche ( $n=75$ ) et violet pour Valenciana ( $n=75$ ).

La variété Mollar de Elche semble présenter des teneurs en polyphénols totaux et punicalagine plus élevées que Valenciana. En effet, en moyenne dans toutes les méthodes de conservation et quelle que soit la durée de conservation, 162 mg eag/g ms de polyphénols totaux et 70 mg/g ms de punicalagine sont retrouvés dans les péricarpes de Mollar de Elche alors que des teneurs de 107 mg eag/g ms et 46 mg/g ms sont présentes dans ceux de Valenciana. En revanche, les péricarpes de grenades Valenciana contiennent des teneurs plus importantes en extractibles au méthanol, punicaline et acide ellagique (52 % g/g ms, 1,4 et 4,7 mg/g ms, respectivement) que ceux de la variété Mollar de Elche (47 % g/g ms, 0,9 et 3,1 mg/g ms, respectivement).

La composition chimique des péricarpes des grenades Mollar de Elche et Valenciana semble donc différente sur tous les composés étudiés. L'effet de la variété de grenade sur la composition des péricarpes a été discuté en détail dans le chapitre précédent, mais les conclusions sont en accord avec ces observations. La comparaison des compositions chimiques des péricarpes Mollar de Elche et Valenciana est similaire à celle établie pour les grenades des deux variétés non conservées, et semble plus marquée pour les lots conservés. Cela suggère que les deux variétés ont une



composition chimique différente et qui évolue de manière distincte au cours de la conservation. Par conséquent, une analyse en composantes principale a été conduite pour chaque variété de manière séparée, afin de représenter seulement les variations entre échantillons liées à la condition de conservation.

#### 4.2.1.d. Évolution de la composition chimique des péricarpes de la variété Mollar de Elche au cours de la conservation des grenades

Les résultats de l'analyse en composantes principale de la composition chimique des péricarpes de la variété Mollar de Elche sont présentés sur le tableau 4.10.

Les trois premières composantes principales PC1, PC2 et PC3 représentent bien les différences de composition entre les lots de péricarpes avec une variance expliquée de 50,9 et 18,6 et 18,2 % respectivement, soit presque 90 % de la variabilité entre les échantillons. Contrairement à l'analyse de l'ensemble des deux variétés, pour évaluer l'évolution de la composition des péricarpes de la variété Mollar de Elche trois dimensions sont nécessaires. En effet, les teneurs en polyphénols totaux (polyphenols.totaux), punicalagine et punicaline sont représentées significativement principalement sur PC1 ; le rendement en extractibles (rdt\_meoh) sur PC2 ; et la teneur en acide ellagique (a.ellagique) sur PC3. La représentation de l'ensemble des composés quantifiés dans les péricarpes de cette variété nécessite donc la prise en compte les trois premières composantes.

Tableau 4.10 : Variables (composition chimique) et facteurs interprétables (condition et durée de conservation) de l'analyse en composante principale des échantillons de péricarpes des grenades Mollar de Elche. Les variables et facteurs interprétables sur chaque composante sélectionnée (PC1, PC2 et PC3) sont mis en évidence en gras.

Variable	Code variable	PC1 (50,9 %)	p (PC1)	PC2 (18,6 %)	p (PC2)	PC3 (18,2 %)	p (PC3)
<b>Variable</b>							
Rendement extrait (g/100g ms)	rdt_meoh	0,36	0,0016	<b>0,82</b>	<b>&lt;0,0001</b>	-0,43	1e-04
Polyphénols totaux (mg eag/g ms)	polyphenols.totaux	<b>0,85</b>	<b>&lt;0,0001</b>	-0,24	0,0356	-0,17	0,1421
Punicalagine (mg/g ms)	punicalagine	<b>0,90</b>	<b>&lt;0,0001</b>	-0,20	0,0815	-0,26	0,0254
Punicaline (mg/g ms)	punicaline	<b>0,80</b>	<b>&lt;0,0001</b>	-0,11	0,361	0,21	0,0714
Acide ellagique (mg/g ms)	a.ellagique	0,48	<0,0001	0,38	9e-04	<b>0,76</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Facteur étudié</b>							
Condition conservation			<b>&lt;0,0001</b>		<b>&lt;0,0001</b>		<b>1e-04</b>
Durée conservation (semaine)			0,4261		<b>&lt;0,0001</b>		<b>0,0023</b>

Les relations entre les composés quantifiés dans les péricarpes sont données sur la figure **4.13**, à l'aide des trois plans formés par les composantes (PC1,PC2), (PC1,PC3) et (PC2,PC3) sur respectivement les encarts **4.13-A**, **4.13-B** et **4.13-C**.

Les teneurs en polyphénols totaux et punicalagine semblent fortement corrélées, ce qui suggère que plus la teneur en punicalagine des péricarpes des grenades Mollar de Elche est élevée, plus la teneur en polyphénols totaux l'est aussi. Cela indique aussi que la quantification d'une teneur ou de l'autre pourrait être suffisante pour juger de l'évolution des deux grandeurs au cours de la conservation des grenades.

La teneur en punicaline des péricarpes de Mollar de Elche semble être faiblement corrélée à celle des deux précédents ellagitannins, mais suivrait la même tendance, à l'inverse de la teneur en acide ellagique et du rendement en extractibles qui semblent indépendants des trois autres teneurs.

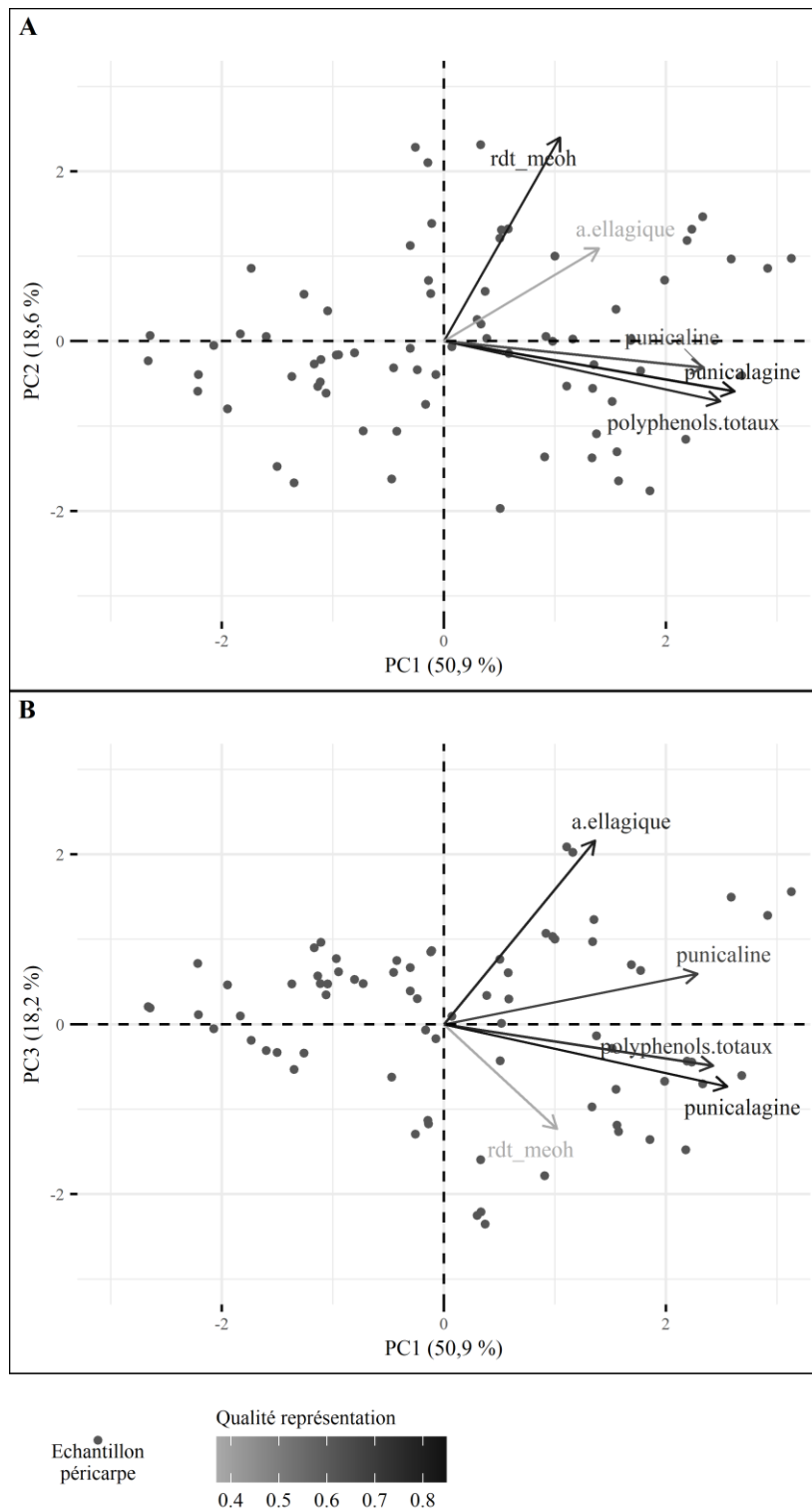


Figure 4.13 : Relations entre les teneurs en composés ciblés des péricarpes des grenades Mollar de Elche au cours de leur conservation. Représentation sur les plans formés par les composantes PC1,PC2 (A) et PC1,PC3 (B) des individus (points, 25 échantillons, 3 répétitions) et de leurs variables (composés). La qualité de la représentation des composés (vecteurs) sur les plans est donnée par un indice croissant de gris à noir.

#### 4.2.1.d.i. Effet de la durée de conservation des grenades sur les teneurs en polyphénols des péricarpes

Les échantillons de péricarpes des grenades Mollar de Elche peuvent être distingués significativement ( $p < 0,05$ ) par les durées de conservation sur les composantes PC2 et PC3 (tableau 4.10). L'effet de la durée de conservation des grenades sur la composition des péricarpes est par conséquent principalement expliqué par des variations du rendement en extractibles au méthanol et de la teneur en acide ellagique. La figure 4.14 représente les échantillons de péricarpes Mollar de Elche par durée de conservation.

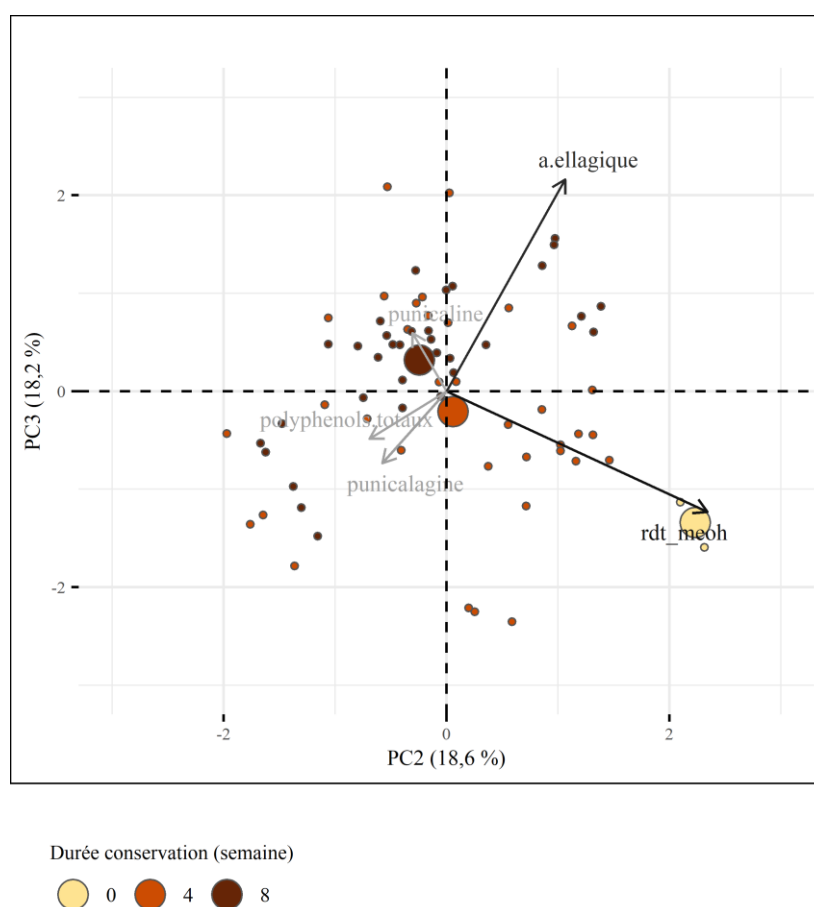


Figure 4.14 : Effet de la durée de conservation des grenades Mollar de Elche sur les teneurs en polyphénols de leurs péricarpes. Représentation sur les plans formés par les composantes PC2, PC3 des individus (points), de leurs barycentres et de leurs variables (composés). La qualité de la représentation des composés (vecteurs) sur les plans est donnée par un indice croissant de gris à noir et les durées de conservation sont représentées en couleur, 0 semaine : jaune ( $n=3$ ), 4 semaines : orange ( $n=36$ ), 8 semaines : marron ( $n=36$ ).

Les grenades conservées 0 semaines semblent présenter un rendement en extractibles supérieur aux lots conservés 4 et 8 semaines, et une teneur en acide ellagique légèrement plus faible. En effet, les péricarpes de Mollar de Elche avant la conservation contiennent 58 % d'extractibles au méthanol puis 48 et 45 % après 4 et 8 semaines de conservation. En revanche, la teneur en acide ellagique augmente de 3,1 à 3,2 mg/g ms au cours de la conservation, ce qui semble négligeable.

L'augmentation de la durée de conservation de 0 à 8 semaines semble avoir un effet négligeable sur les teneurs en polyphénols totaux, punicalagine et punicaline des péricarpes. Les péricarpes des grenades Mollar de Elche conservées de 0 à 8 semaines ont une teneur en polyphénols totaux variant de 159 à 165 mg eag/g ms, en punicalagine de 67 à 72 mg/g ms et en punicaline de 0,7 à 0,9 mg/g ms en moyenne sur l'ensemble des conditions de conservation ("S02"- "S13"). La conservation des grenades Mollar de Elche semble donc entraîner principalement une diminution du rendement en extractibles au méthanol des péricarpes.

Les différences de compositions des péricarpes dues à la méthode de conservation des grenades Mollar de Elche sont représentées significativement ( $p < 0,05$ ) sur les composantes PC1, PC2 et PC3 (tableau 4.10). Par conséquent, l'effet du mode de conservation des grenades Mollar de Elche est expliqué par tous les composés quantifiés dans les péricarpes. Cet effet sera abordé à travers les effets de l'humidité, la température et l'immersion des grenades avant leur conservation.

#### 4.2.1.d.ii. Effet de l'humidité de conservation

L'effet de l'humidité environnante (figure 4.15) sur la composition des péricarpes lors de la conservation des grenades peut être évalué par la comparaison des conditions de conservation à température identiques, c'est-à-dire les conditions "S02" et "S03" à 17 °C, et les conditions "S04" et "S05" à 4 °C pour lesquelles l'humidité est supérieure à l'humidité ciblée supérieure à 82 %. Par conséquent la différence entre ces conditions réside principalement par la conservation à atmosphère ambiant ("S04") ou dans des contenants hermétiques ("S05").

A la température de 17 °C, la conservation des grenades Mollar de Elche à une humidité relative supérieure à 92 % semble produire des co-produits contenant des teneurs en polyphénols totaux, punicalagine et punicaline et un rendement en extractibles plus élevés que lorsque les grenades sont placées à 63 % d'humidité. En effet, les teneurs en polyphénols totaux, punicalagine et punicaline des péricarpes des grenades placées à une humidité relative élevée sont respectivement de 167 mg eag/g ms, 82 et 1,3 mg/g ms alors que celles des grenades placées à humidité ambiante sont de 165 mg eag/g ms, 67 et 1,1 mg/g ms, respectivement. Le rendement en extractibles évolue de 48 à 53 % lorsque l'humidité relative est plus élevée. Les variations des teneurs en acide ellagique semblent faibles comparées à celles des polyphénols précédents, car elle varie de 3,6 à 3,9 mg/g ms lorsque l'humidité est plus importante.

A 17 °C, les évolutions les plus importantes de la composition des péricarpes liées à une augmentation de l'humidité relative sont une élévation de la teneur en punicalagine et du rendement en extractibles qui augmentent respectivement de 15 mg/g ms et de 5 %.

Lorsque les grenades Mollar de Elche sont placées à 4 °C dans des contenants fermés hermétiquement ("S05"), le rendement en extractibles au méthanol et la teneur en acide ellagique semblent plus élevés que les grenades placées à atmosphère ambiant ("S04"), alors que les teneurs en polyphénols totaux, punicalagine et punicaline semblent plus faibles. Dans la première condition, les péricarpes contiennent 52 %

d'extractibles et 3,2 mg/g d'acide ellagique alors que dans la seconde ils contiennent 49 % d'extractibles et 2,8 mg/g d'acide ellagique. Ces variations de 3 % et moins d'un milligramme semblent faibles. Les grenades conservées dans des contenants hermétiques montrent des teneurs en polyphénols totaux, punicalagine et punicaline de 172 mg eag/g, 72 et 0,7 mg/g ms et celles placées à atmosphère ambiante montrent des teneurs de 173 mg eag/g, 81 et 2,8 mg/g ms.

Par conséquent, les évolutions principales de la composition des péricarpes des grenades lorsqu'elles sont placées dans des bacs à humidité relative contrôlée semble résider dans une diminution de 10 mg/g ms de la teneur en punicalagine et une augmentation de 3 % du rendement en extractibles.

#### **4.2.1.d.iii. Effet de la température de conservation**

L'effet de la température de conservation des grenades sur leur composition peut être évalué par comparaison des conditions "S03", "S05" et "S07", pour lesquelles l'humidité relative est équivalente. Les échantillons de péricarpes de la variété Mollar de Elche sont représentés par température sur la figure 4.16.

A humidité de conservation contrôlée, les grenades placées à 17 °C ("S03") semblent montrer des teneurs en polyphénols plus importantes que celles conservées à 4 °C ("S05") alors que le rendement en extractibles paraît similaire. En effet, les teneurs en polyphénols totaux, punicalagine, punicaline et acide ellagique sont respectivement de 167 mg eag/g ms, 82, 1,3 et 3,9 mg/g ms dans la condition "S03", et 172 mg eag/g ms, 72, 0,7 et 3,2 mg/g ms dans la condition "S04", alors que les rendements en extractibles sont de 52-53 % entre les deux conditions. La diminution de la température de conservation des grenades Mollar de Elche, à une humidité relative supérieure à 92 %, semble donc principalement entraîner une diminution de la teneur en punicalagine de 10 mg/g, une augmentation de la teneur polyphénols totaux de 5 mg/g ms et des variations des autres polyphénols et extractibles faibles.

L'acclimatation des grenades à 15 °C avant de les placer à 4 °C ("S07") semble entraîner des teneurs en polyphénols plus importantes que lorsque les grenades ne sont pas acclimatées ("S05"), et induire une diminution du rendement en extractibles. Les péricarpes des grenades acclimatées contiennent 179 mg eag/g ms de polyphénols totaux, 76 mg/g de punicalagine, 1,0 mg/g ms de punicaline, 2,9 mg/g ms d'acide ellagique, et 45 % d'extractibles. L'acclimatation des grenades semble donc principalement affecter les teneurs en polyphénols totaux et punicalagine qui augmentent respectivement de 7 mg eag/g (4 %) et 4 mg/g (6 %), mais aussi le rendement en extractible avec une diminution de 7 %.

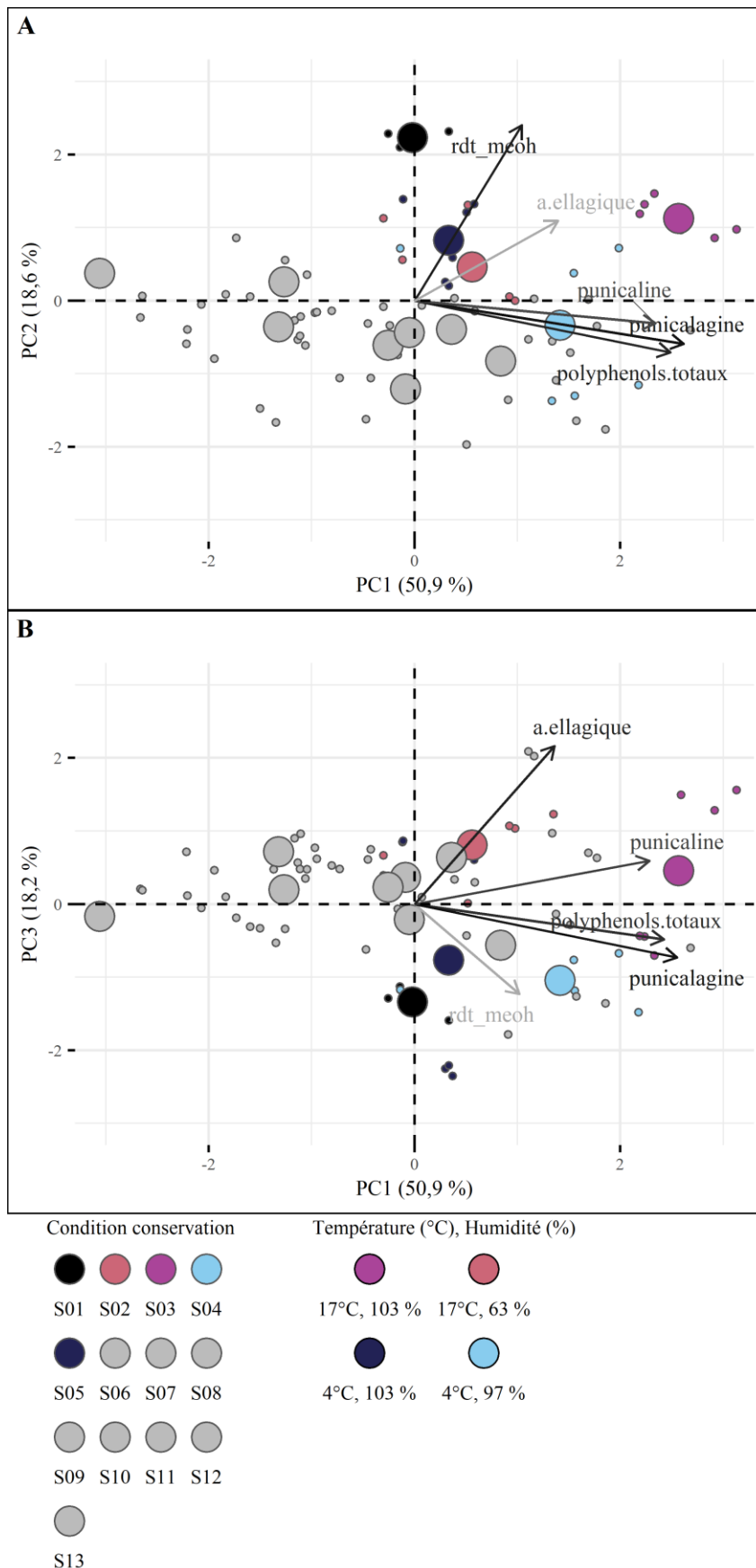


Figure 4.15 : **Effet de l'humidité de conservation des grenades Mollar de Elche sur les teneurs en polyphénols de leurs péricarpes.** Représentation sur les plans formés par les composantes PC1,PC2 (A) et PC2,PC3 (B) des individus (échantillons analysés à 4 et 8 semaines, points), de leurs barycentres et de leurs variables (composés). La qualité de la représentation des composés (vecteurs) sur les plans est donnée par un indice croissant de gris à noir et les humidités relative de conservation sont représentées en couleur : 17°C, 63 % : rose (n=6) - 17°C, 103 % : magenta (n=6) - 4°C, 97 % : cyan (n=6) - 4°C, 103 % : bleu (n=6).

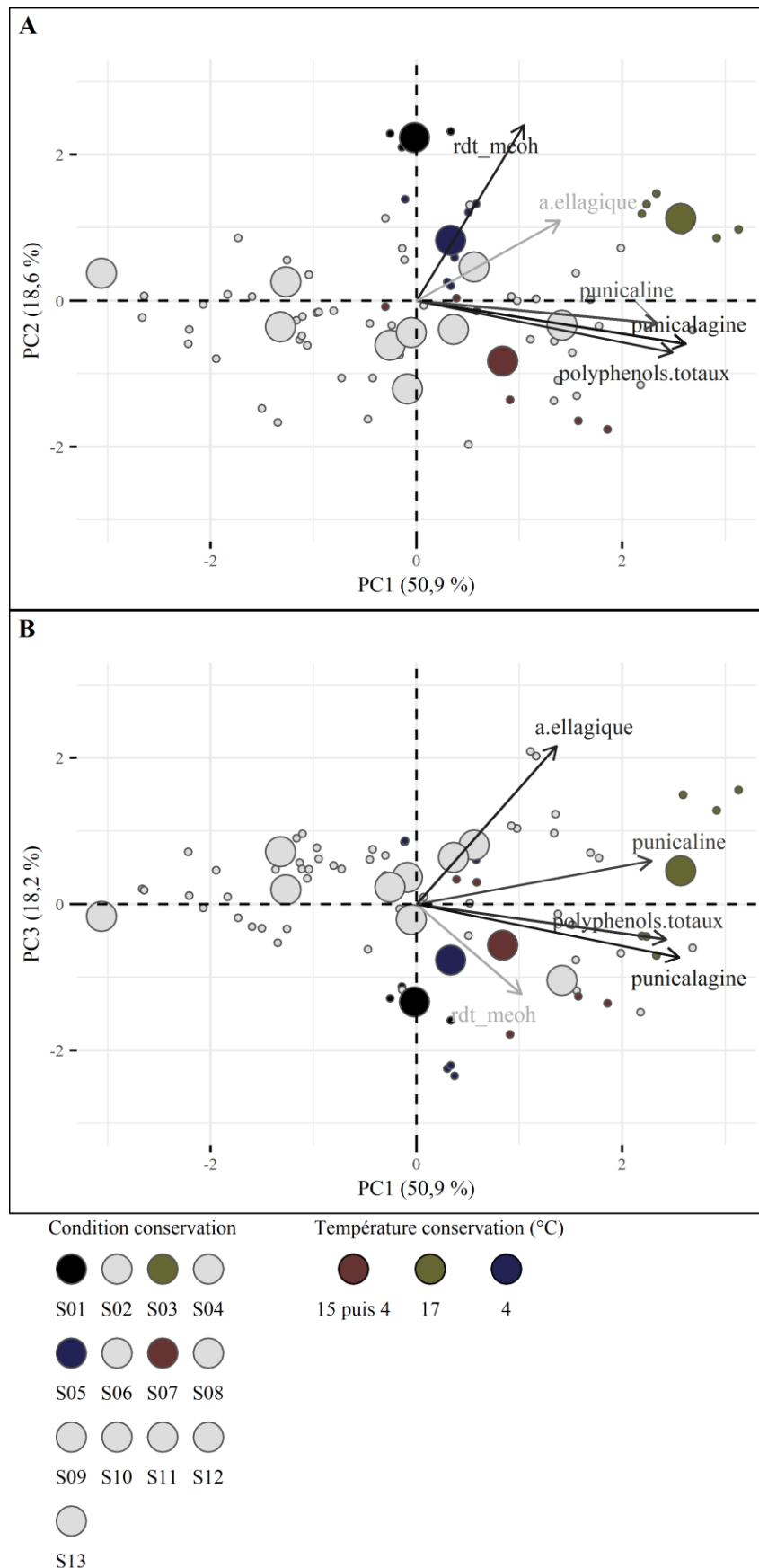


Figure 4.16 : **Effet de la température de conservation des grenades Mollar de Elche sur les teneurs en polyphénols de leurs péricarpes.** Représentation sur les plans formés par les composantes PC1,PC2 (A) et PC2,PC3 (B) des individus (échantillons analysés à 4 et 8 semaines, points), de leurs barycentres et de leurs variables (composés). La qualité de la représentation des composés (vecteurs) sur les plans est donnée par un indice croissant de gris à noir et les températures de conservation sont représentées en couleur : 15 puis 4°C : rouge (n=6) - 17°C : kaki (n=6) - 4°C : bleu (n=6).



#### 4.2.1.d.iv. Effet de l'immersion

L'effet de l'immersion des grenades Mollar de Elche sur la composition de leurs péricarpes peut être déterminé par comparaison des grenades non immergées ("S06") avec les grenades traitées ("S08"- "S13"), toutes conservées à 7 °C et 80 % d'humidité. Les échantillons de péricarpe sont représentés selon la méthode d'immersion sur la figure 4.17.

Trois groupes d'échantillons semblent pouvoir être formés. Le premier comporte les échantillons de péricarpes obtenus dans la condition "S13", le second ceux des conditions "S09" et "S10", et le troisième ceux des conditions "S06", "S08", "S11" et "S12". Les teneurs en polyphénols totaux, punicalagine et punicaline semblent augmenter de manière croissante du groupe 1 au groupe 3. Par rapport au témoin sans immersion, les groupes 1 et 2 semblent montrer des teneurs en polyphénols plus faibles, et le groupe 3 des teneurs similaires.

En effet, les teneurs en polyphénols totaux sont en moyenne de 125 et 149 mg eag/g ms dans les groupes 1 et 2, respectivement, ce qui correspond à 25 et 11 % de moins que les échantillons de grenades non immergées (167 mg eag/g ms), et celles du groupe 3 se situent entre 163 et 168 mg eag /g ms. En outre, les teneurs en punicalagine sont en moyenne de 54 et 63 mg/g ms et celles en punicaline de 0,7 et 0,8 mg/g, dans les groupes 1 et 2, respectivement, alors que les échantillons appartenant au groupe 3 présentent entre 69 et 72 mg/g ms de punicalagine et 0,9 mg/g ms de punicaline. Les échantillons des conditions "S09", "S10" "S13" comportent entre 10 et 20 % de punicalagine et punicaline en moins que ceux obtenus dans les grenades non immergées.

L'immersion des grenades dans une solution d'*Aloe vera* à 55 °C ("S13"), de l'eau à 55 °C ("S09") ou une solution de bicarbonate de sodium à 20 °C ("S10") semble donc entraîner une diminution des teneurs en polyphénols totaux, punicalagine et punicaline. Au regard des teneurs présentes, les diminutions en polyphénols totaux et punicalagine semblent les plus importantes. En revanche, le rendement en extractibles, compris entre 41 et 46 %, et la teneur en acide ellagique, comprise entre 2,5 et 3,5 mg/g ms, ne semblent pas varier de manière importante avec l'immersion des grenades.

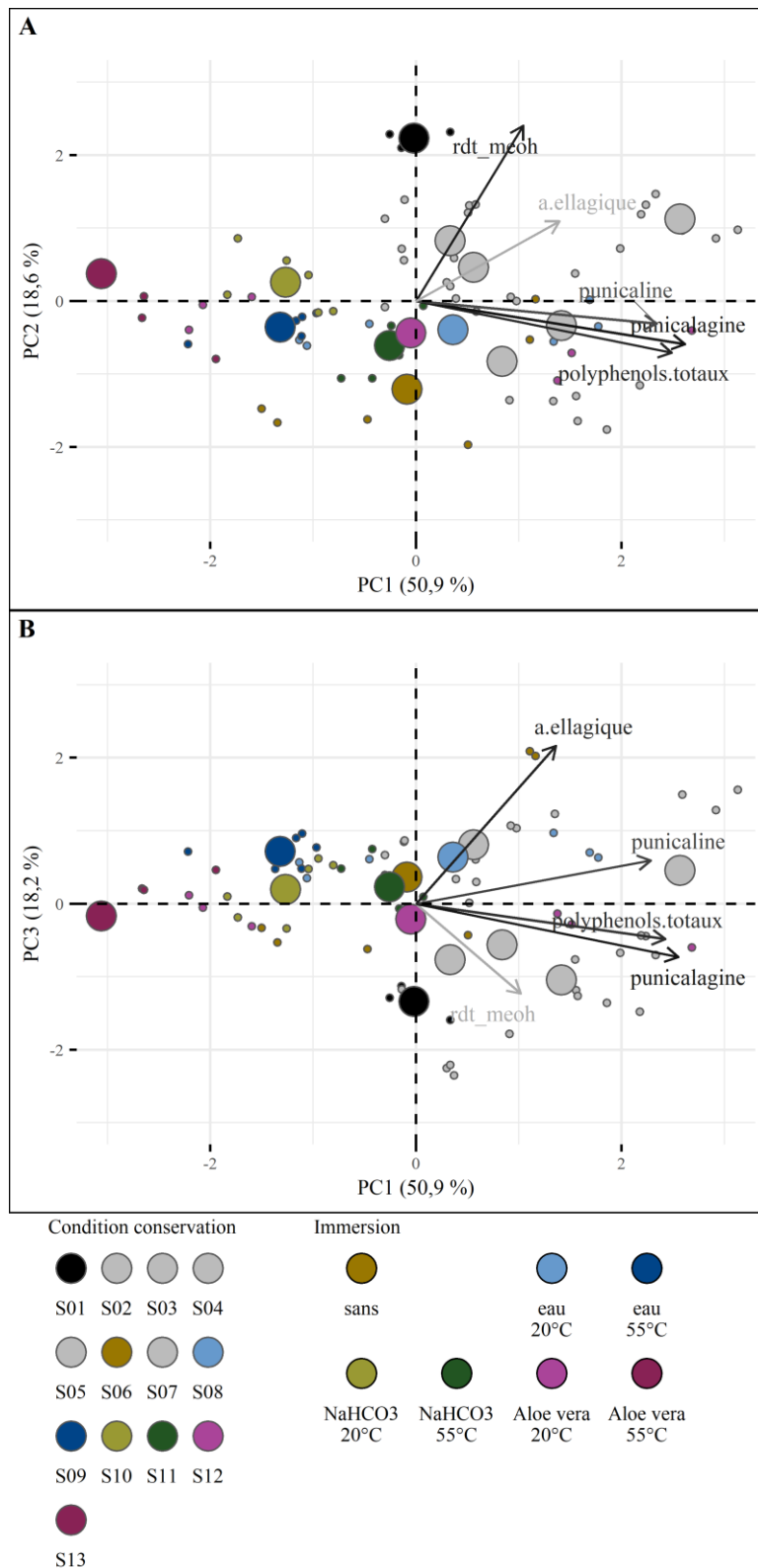


Figure 4.17 : **Effet de l'immersion avant la conservation des grenades Mollar de Elche sur les teneurs en polyphénols de leurs péricarpes.** Représentation sur les plans formés par les composantes PC1,PC2 (A) et PC2,PC3 (B) des individus (échantillons analysés à 4 et 8 semaines, points), de leurs barycentres, et de leurs variables (composés). La qualité de la représentation des composés (vecteurs) sur les plans est donnée par un indice croissant de gris à noir et les méthodes d'immersion sont représentées en couleur (n=6 pour les 7 conditions).

#### 4.2.1.d.v. Relation entre la composition moléculaire et les caractéristiques qualitatives des grenades Mollar de Elche au cours de leur conservation

L'effet de la conservation des grenades Mollar de Elche sur la composition de leurs péricarpes pourrait être lié aux variations de l'intégrité du fruit entier. Cette relation peut être établie en partie par la corrélation des caractéristiques qualitatives des grenades avec le rendement en extractibles et les teneurs en polyphénols des péricarpes décrits précédemment.

La masse, la couleur et les taux d'altérations du péricarpe moyens observés sur les lots de grenades conservées 0, 4 et 8 semaines ont donc été mis en relation avec la composition des péricarpes moyennée pour chacune de ces durées. Ces relations sont présentées dans une matrice des corrélations dans le tableau 4.11.

Tableau 4.11 : Relation entre la composition moléculaire des péricarpes et la masse, la couleur et l'aspect des grenades Mollar de Elche au cours de leur conservation (n=12 à 0, 4 et 8 semaines).

Composition ou Aspect	Rendement extractibles	Teneur polyphénols totaux	Teneur punicalagine	Teneur punicaline	Teneur acide ellagique	Masse relative	Différence couleur	Taux éclatement	Taux craquelure	Taux altération physiologique ou microbienne
Rendement extractibles (g/100g ms)	1,00	ns	ns	ns	ns	0,56	-0,60	ns	ns	ns
Teneur polyphénols totaux (mg eag/g ms)	ns	1,00	<b>0,82</b>	0,52	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Teneur punicalagine (mg/g ms)	ns	<b>0,82</b>	1,00	<b>0,66</b>	ns	0,42	ns	ns	ns	ns
Teneur punicaline (mg/g ms)	ns	0,52	<b>0,66</b>	1,00	0,42	ns	ns	ns	0,44	ns
Teneur acide ellagique (mg/g ms)	ns	ns	ns	0,42	1,00	ns	ns	ns	0,42	ns
Masse relative à la masse initiale	0,56	ns	0,42	ns	ns	1,00	-0,64	ns	ns	ns
Différence de couleur à la couleur initiale	-0,60	ns	ns	ns	ns	-0,64	1,00	ns	ns	ns
Taux d'éclatement (%)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Taux de craquelure (%)	ns	ns	ns	0,44	0,42	ns	ns	ns	1,00	ns
Taux d'altérations physiologique ou microbienne (%)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1,00

Les corrélations ont été produites avec la méthode de Pearson à partir des résultats moyennés les semaines 0, 4 et 8. Seuls les coefficients (r) de corrélations significatifs (p<0,05) sont affichés alors que les corrélations non significatives (p>0,05) sont représentées par "ns". Les coefficients élevés (|r|>0,65) sont mis en évidence en gras.

Concernant les relations entre les composés quantifiés des péricarpes, le rendement en extractibles au méthanol et la teneur en acide ellagique semblent indépendants (|r|<0,5

ou  $p < 0,05$ ) des autres teneurs en polyphénols quantifiés. De la même manière, la teneur en polyphénols totaux est fortement corrélée à la teneur en punicalagine ( $r = 0,8$ ,  $p < 0,05$ ) et faiblement celle en punicaline ( $r = 0,5$ ,  $p < 0,04$ ), alors que les teneurs des deux ellagitannins sont corrélées ( $r = 0,7$ ,  $p < 0,05$ ). Ces relations entre le rendement en extractibles et les teneurs en polyphénols des péricarpes sont cohérentes avec celles exposées précédemment.

Les corrélations de ces teneurs avec les observations qualitatives des grenades montrent une faible corrélation ( $|r| = 0,6$ ,  $p < 0,05$ ) entre le rendement en extractibles et la masse relative ou la différence de couleur. Cela pourrait indiquer que les grenades dont la masse relative diminue fortement au cours de la conservation ont aussi un rendement qui diminue, et celles dont le changement de couleur est plus important ont un rendement en extractibles plus faible. Les autres corrélations sont très faibles ou non significatives.

Toutefois, les coefficients de corrélation sont tous inférieurs à 0,65 ou non significatifs ( $p < 0,05$ ). L'évolution de la composition des péricarpes de grenades Mollar de Elche ne semble donc pas liée fortement aux variations de masse, couleur et aux altérations superficielles des grenades.

#### **4.2.1.e. Évolution de la composition chimique des péricarpes de la variété Valenciana au cours de la conservation des grenades**

Les résultats de l'analyse en composantes principales de la variété Valenciana sont données ci-après sur le tableau **4.12**. Les trois premières composantes PC1, PC2 et PC3 expliquent respectivement 49,6 et 21,3 et 17,4 % de la variabilité entre les échantillons analysés pour un total de 88,3 %. Ces trois composantes représentent donc presque 90 % de la dispersion entre les échantillons et par conséquent décrivent bien les variations de composition des péricarpes des grenades Valenciana au cours de leur conservation.

Contrairement à la variété Mollar de Elche, la composante PC1, qui représente la majorité des variations entre les échantillons, explique de manière importante les teneurs en punicaline ( $r = 0,91$ ,  $p < 0,05$ ) et en acide ellagique ( $r = 0,91$ ,  $p < 0,05$ ). Cela signifie que les principales variations de composition en polyphénols des péricarpes des grenades Valenciana sont dues aux teneurs en punicaline et acide ellagique, alors que celles des grenades Mollar de Elche sont dues aux teneurs en polyphénols totaux et punicalagine. Cela confirme que les deux variétés ont des sensibilités différentes à la conservation. Les variations du rendement en extractibles au méthanol (rdt\_meoh) des péricarpes sont expliquées principalement par la composante PC2, comme pour la variété Mollar de Elche. Les trois premières composantes n'expliquent pas de manière importante les teneurs en polyphénols totaux (polyphenols.totaux) et en punicalagine qui présentent des coordonnées inférieures à 0,65. Cela se traduit par le fait que les variations de ces deux teneurs ne peuvent pas être attribuées à la conservation, contrairement aux trois autres teneurs.

Tableau 4.12 : Variables (composition chimique) et facteurs interprétables (condition et durée de conservation) de l'analyse en composante principale des échantillons de péricarpes des grenades Mollar de Elche. Les variables et facteurs interprétables sur chaque composante sélectionnée (PC1, PC2 et PC3) sont mis en évidence en gras.

Code variable		PC1 (49,6 %)	p (PC1)	PC2 (21,3 %)	p (PC2)	PC3 (17,4 %)	p (PC3)
<b>Variable</b>							
Rendement extrait (g/100g ms)	rdt_meoh	-0,33	0,0039	<b>0,86</b>	<b>&lt;0,0001</b>	-0,14	0,2179
Polyphénols totaux (mg eag/g ms)	polyphenols.totaux	-0,58	<0,0001	0,36	0,0014	0,60	<0,0001
Punicalagine (mg/g ms)	punicalagine	-0,62	<0,0001	-0,38	9e-04	0,51	<0,0001
Punicaline (mg/g ms)	punicaline	<b>0,91</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,11	0,3496	0,34	0,0029
Acide ellagique (mg/g ms)	a.ellagique	<b>0,91</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,18	0,125	0,34	0,0032
<b>Facteur étudié</b>							
Condition conservation			<b>&lt;0,0001</b>		<b>&lt;0,0001</b>		<b>&lt;0,0001</b>
Durée conservation (semaine)			0,1569		<b>&lt;0,0001</b>		0,1758

La représentation des variables et leurs relations sont données sur la figure 4.18 sur les trois plans formés par les trois composantes sélectionnées PC1,PC2 (4.18-A) ; PC1,PC3 (4.18-B) ; PC2,PC3 (4.18-C). Les teneurs en punicaline et acide ellagique semblent corrélées positivement, c'est-à-dire que plus la teneur en punicaline est élevée, plus celle en acide ellagique l'est aussi. La relation entre ces deux teneurs est différente de celle observée pour Mollar de Elche, pour laquelle elles ne semblaient pas corrélées. Par conséquent, la différence entre l'évolution de la composition des péricarpes des deux variétés au cours de la conservation des grenades pourrait résider dans les teneurs de ces deux ellagitannins. Comme pour la variété Mollar de Elche, les teneurs en punicalagine et polyphénols totaux semblent corrélées, particulièrement sur le plan PC1,PC3 (figure 4.18-B). Leur faible importance dans l'explication des différences entre les échantillons de péricarpes de Valenciana est reflétée par leur faible qualité de représentation sur deux des trois plans où elles apparaissent, en gris. Finalement, de manière similaire à Mollar de Elche, le rendement en extractibles au méthanol semble bien différencier les échantillons de péricarpes Valenciana sans être lié aux autres composés quantifiés.

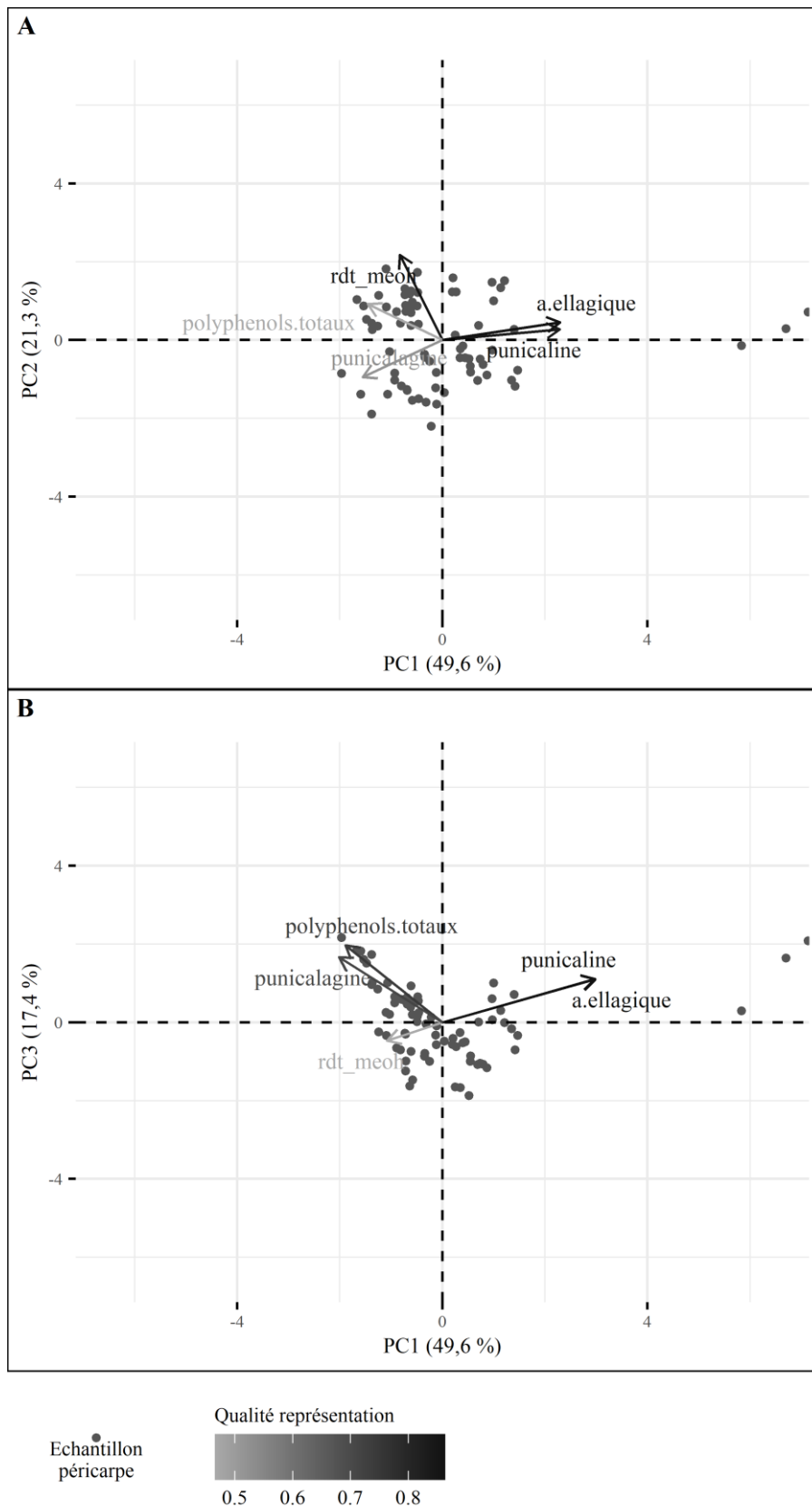


Figure 4.18 : Relations entre les teneurs en composés ciblés des péricarpes des grenades Valenciana au cours de leur conservation. Représentation sur les plans formés par les composantes PC1,PC2 (A) et PC1,PC3 (B) des individus (25 échantillons, 3 répétitions, points) et de leurs variables (composés). La qualité de la représentation des composés (vecteurs) sur les plans est donnée par un indice croissant de gris à noir.

#### 4.2.1.e.i. Effet de la durée de conservation

Les échantillons de péricarpes ont été obtenus de grenades conservées durant 0 à 8 semaines dans 12 conditions de conservation (“S02”-“S13”), la treizième (“S01”) correspondant aux grenades Valenciana non conservées. La différence de composition entre les péricarpes des grenades conservées à plusieurs durées de conservation (0, 4 et 8 semaine) est représentée significativement ( $p < 0,05$ ) sur PC2 uniquement, donc liée principalement au rendement en extractibles des péricarpes (tableau 4.12).

L’effet de la durée de conservation sur la composition des péricarpes des grenades Valenciana est représenté sur la figure 4.19.

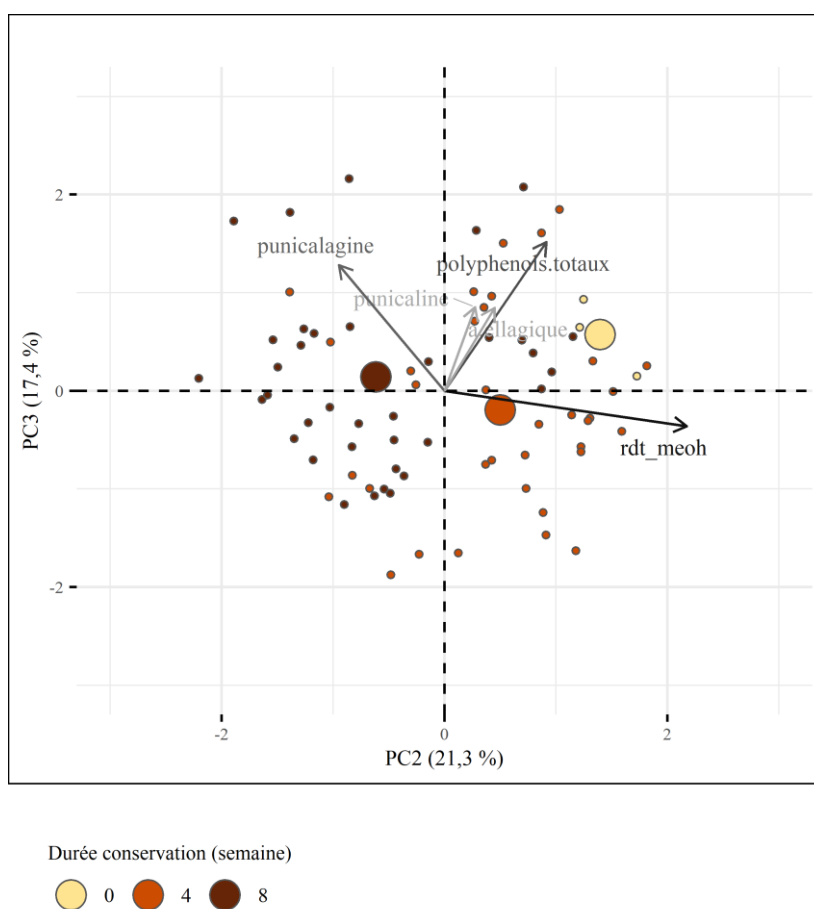


Figure 4.19 : Effet de la durée de conservation des grenades Valenciana sur les teneurs en polyphénols de leurs péricarpes. Représentation sur les plans formés par les composantes PC2, PC3 des individus, de leurs barycentres (points) et de leurs variables (composés). La qualité de la représentation des composés (vecteurs) sur les plans est donnée par un indice croissant de gris à noir et les durées de conservation sont représentées en couleur, 0 semaine : jaune (n=3), 4 semaines : orange (n=36), 8 semaines : marron (n=36).

Le rendement en extractibles des péricarpes semble diminuer avec l’augmentation de la durée de conservation de 0 à 8 semaines. Les péricarpes des grenades Valenciana avant leur conservation contiennent 56 % d’extractibles, et ceux obtenus après 4 et 8 semaines de conservation respectivement 55 et 49 %. En revanche, les teneurs en

punicaline et acide ellagique ne semblent pas évoluer fortement avec l'augmentation de la durée de conservation. En effet leurs teneurs diffèrent de moins de 1 mg/g ms entre les lots conservés 0, 4 et 8 semaines.

Par conséquent, la conservation des grenades Valenciana semble entraîner principalement une diminution du rendement en extractibles.

Les différences de composition liées aux conditions de conservation des grenades sont représentées significativement sur les trois composantes (tableau 4.12), donc les conditions de conservation influencent tous les composés quantifiés, mais de manière prédominante les teneurs en punicaline, acide ellagique et extractibles. Les effets de l'humidité de conservation des grenades à température équivalente (17 °C), de la température de conservation à humidité supérieure à 92 %, et de l'immersion des grenades avant leur conservation à 7 °C et 77 % d'humidité seront détaillés ci-après.

#### 4.2.1.e.ii. Effet de l'humidité

L'effet de l'humidité sur la composition des péricarpes Valenciana peut être évalué à 17 °C par la comparaison des conditions "S02" et "S03". A 4 °C, l'humidité ambiante de la chambre froide (97 %) est proche de celle mesurée dans des contenants hermétiques (103 %). Par conséquent, la comparaison des conditions "S04" et "S05" permet de juger de l'effet du renouvellement de l'air plutôt que l'humidité de conservation.

Les grenades conservées à une humidité supérieure à 92 % et 17 °C (figure 4.20) présentent des teneurs en punicaline (6,3 mg/g ms) et acide ellagique (10,8 mg/g ms) deux fois plus élevées que celles conservées à 63 % d'humidité (3,0 et 5,7 mg/g ms, respectivement), et un rendement en extractibles 2 % plus élevé (52 % g/g ms).

L'augmentation de l'humidité lors de la conservation des grenades Valenciana à 17 °C semble donc entraîner une accumulation de punicaline et d'acide ellagique dans les péricarpes.

Les grenades placées dans des contenants hermétiques ("S05") semblent principalement se différencier de celles placées à atmosphère ambiante ("S04") par des teneurs en punicaline et acide ellagique plus élevées (figure 4.20-A). Néanmoins ces teneurs varient de moins de 1 mg/g ms donc ces variations semblent négligeables. Les rendements en extractibles (figure 4.20-B) des péricarpes obtenus dans ces deux conditions semblent similaires. Leurs valeurs sont en effet de 54 et 55 %.

La conservation à 4 °C et humidité contrôlée ou ambiante en chambre froide ne semble pas influencer fortement la composition des péricarpes des grenades Valenciana.



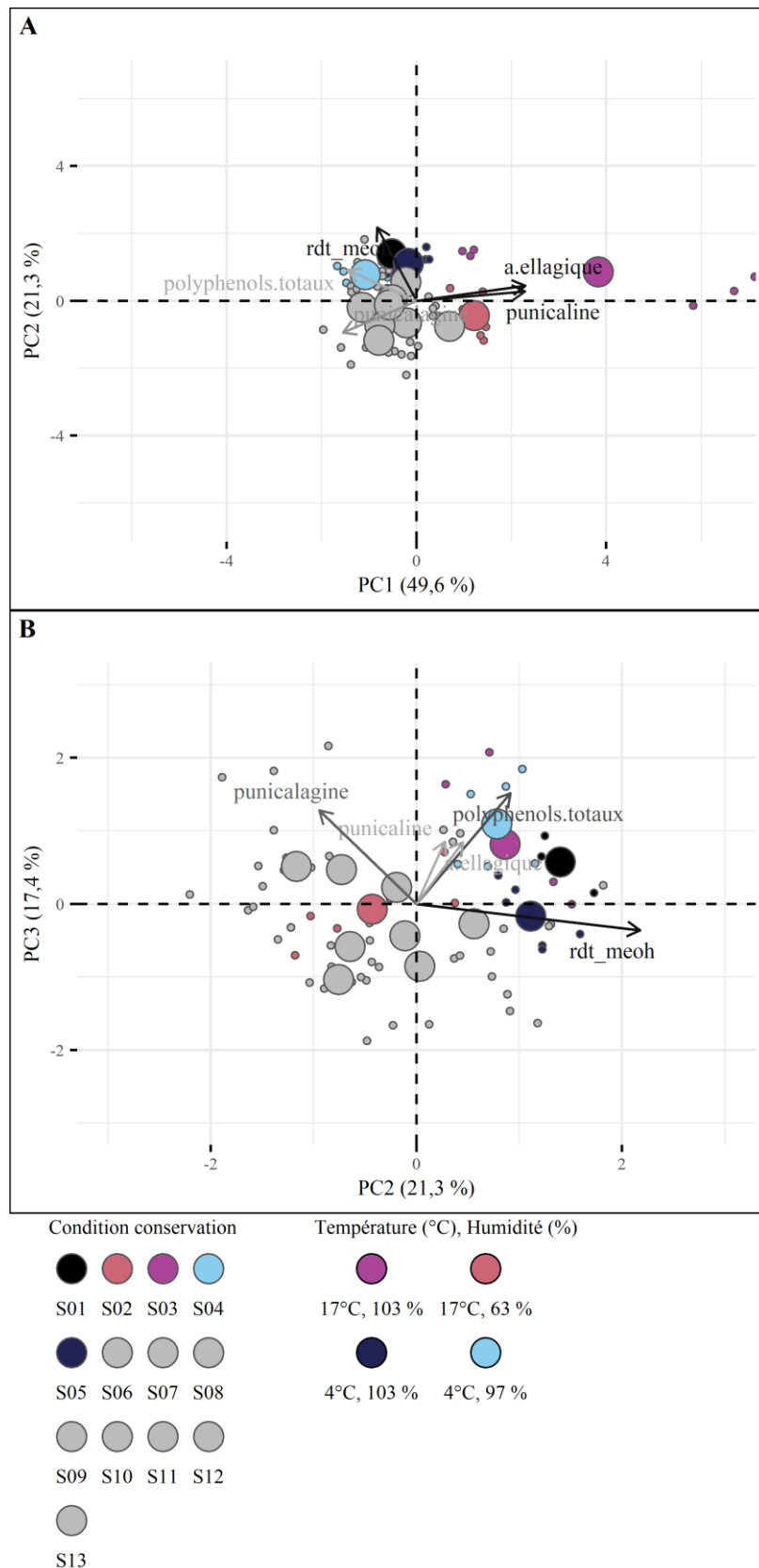


Figure 4.20 : *Effet de l'humidité de conservation des grenades Valenciana sur les teneurs en polyphénols de leurs péricarpes. Représentation sur les plans formés par les composantes PC1,PC2 (A) et PC2,PC3 (B) des individus (échantillons analysés à 4 et 8 semaines, points), de leurs barycentres et de leurs variables (composés). La qualité de la représentation des composés (vecteurs) sur les plans est donnée par un indice croissant de gris à noir et les humidités relative de conservation sont représentées en couleur : 17°C, 63 % : rose (n=6) - 17°C, 103 % : magenta (n=6) - 4°C, 97 % : cyan (n=6) - 4°C, 103 % : bleu (n=6).*

### 4.2.1.e.iii. Effet de la température

L'effet de la température de conservation des grenades Valenciana sur la composition de leur péricarpe peut être évalué par les comparaisons des conditions "S03" et "S05", à 17 et 4 °C et une humidité supérieure à 92 %, et des conditions "S05" et "S07", à 4 °C sans ou avec acclimatation. Les échantillons de péricarpes sont représentés selon ces trois conditions sur la figure 4.21.

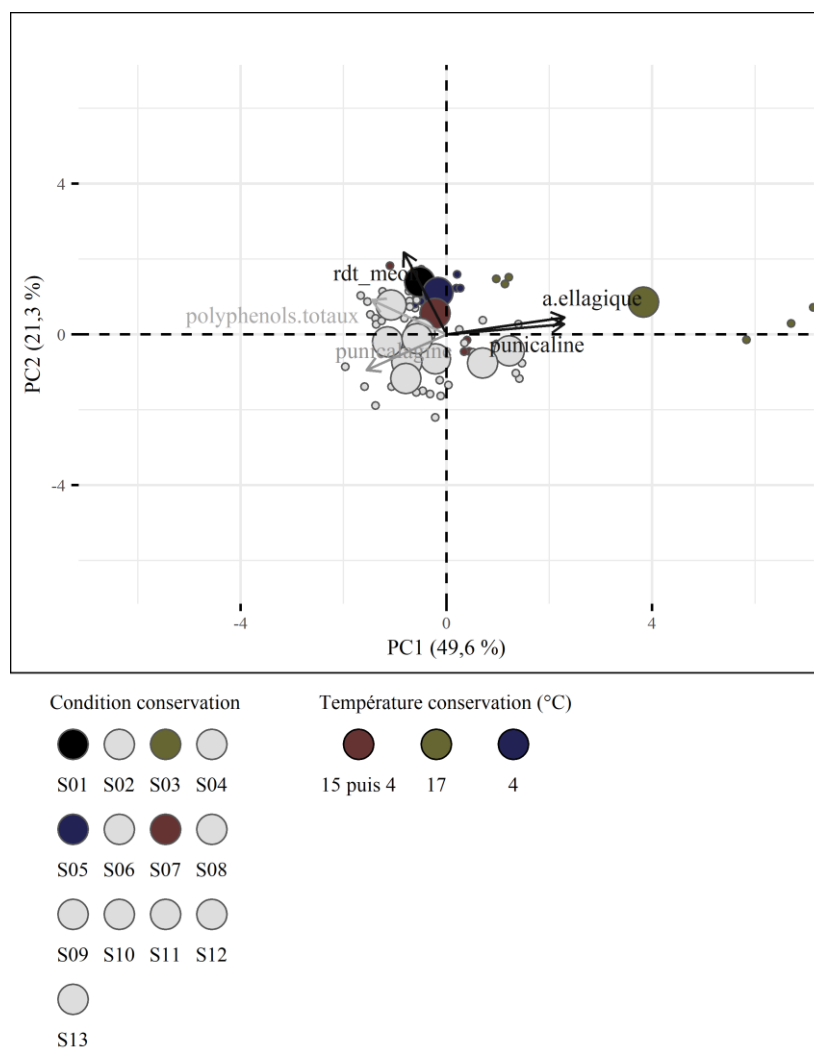


Figure 4.21 : *Effet de la température de conservation des grenades Valenciana sur les teneurs en polyphénols de leurs péricarpes*. Représentation sur les plans formés par les composantes PC1, PC2 des individus (échantillons analysés à 4 et 8 semaines, points), de leurs barycentres et de leur composition (vecteur). La qualité de la représentation des composés (vecteurs) sur les plans est donnée par un indice croissant de gris à noir et les températures de conservation sont représentées en couleur : 15 puis 4°C : rouge (n=6) - 17°C : kaki (n=6) - 4°C : bleu (n=6).

Les péricarpes des grenades conservées à 17 °C et à humidité supérieure à 92 % ("S03") ont des teneurs en punicaline et acide ellagique plus élevées, 6,3 et 10,8 mg/g ms respectivement, que celles conservées à 4 °C avec ("S07") et sans ("S05") acclimatation préalable, qui contiennent 0,8 et 0,9 mg/g ms de punicaline, et 4,2 et 4,7 mg/g ms d'acide ellagique, respectivement. Néanmoins, le rendement en

extractibles au méthanol des péricarpes semble plus élevé lorsque les grenades sont placées à 4 °C sans acclimatation (55 %) ou avec (53 %) qu'à 17 °C (52 %).

L'augmentation de la température de conservation des grenades Valenciana de 4 à 17 °C à humidité contrôlée entraîne des teneurs en punicaline et acide ellagique 7 et 2 fois plus élevées respectivement, et une légère diminution du rendement en extractibles. En revanche, l'acclimatation des grenades Valenciana à 15 °C pendant 10 jours avant leur conservation ne semble pas influencer la composition des péricarpes.

#### 4.2.1.e.iv. Effet de l'immersion

L'effet de l'immersion des grenades Valenciana, avant leur conservation à 7 °C et 80 % d'humidité, dans de l'eau ou des solutions de bicarbonate de sodium ou d'*Aloe vera* à 20 ou 55 °C ("S08"- "S13") peut être évalué par comparaison avec les lots non immergés ("S06"). Les échantillons de péricarpes de chacune de ces conditions sont représentés sur la figure 4.22.

L'immersion des grenades semble entraîner une diminution des teneurs en punicaline et en acide ellagique et une augmentation du rendement en extractibles. En moyenne, les grenades immergées ("S08"- "S13") présentent des teneurs en punicaline et acide ellagique de 0,6 et 3,7 mg/g ms et un rendement en extractibles de 52 %, alors que les péricarpes du lot témoin ("S06") présentent des valeurs respectives de 0,8, 4,4 mg/g ms et 47 %. L'écart le plus important réside dans le rendement en extractibles, qui augmente de 5 % après immersion des grenades.

Parmi les méthodes d'immersion, il semblerait que les grenades conservées après avoir été immergées dans une solution de bicarbonate de sodium à 20 ("S10") ou 55 °C ("S11") ou dans une solution d'*Aloe vera* à 20 °C ("S12") aient un rendement en extractibles plus élevé (54 % en moyenne) que les grenades des autres conditions (50 % en moyenne). En revanche, les teneurs en punicaline (0,5-0,7 mg/g ms) et en acide ellagique (3,4-4,0 mg/g ms) semblent proches entre les co-produits de grenades placées dans les différentes solutions d'immersion avant leur conservation.

L'immersion des grenades Valenciana avant leur conservation à 7 °C et 77 % d'humidité semble accroître le rendement en extractibles au méthanol, en particulier dans une solution de bicarbonate de sodium à 20 ou 55 °C, ou une solution d'*Aloe vera* à 20 °C. Les variations des teneurs en punicaline et acide ellagique semblent négligeables car inférieures à 1 mg/g ms.

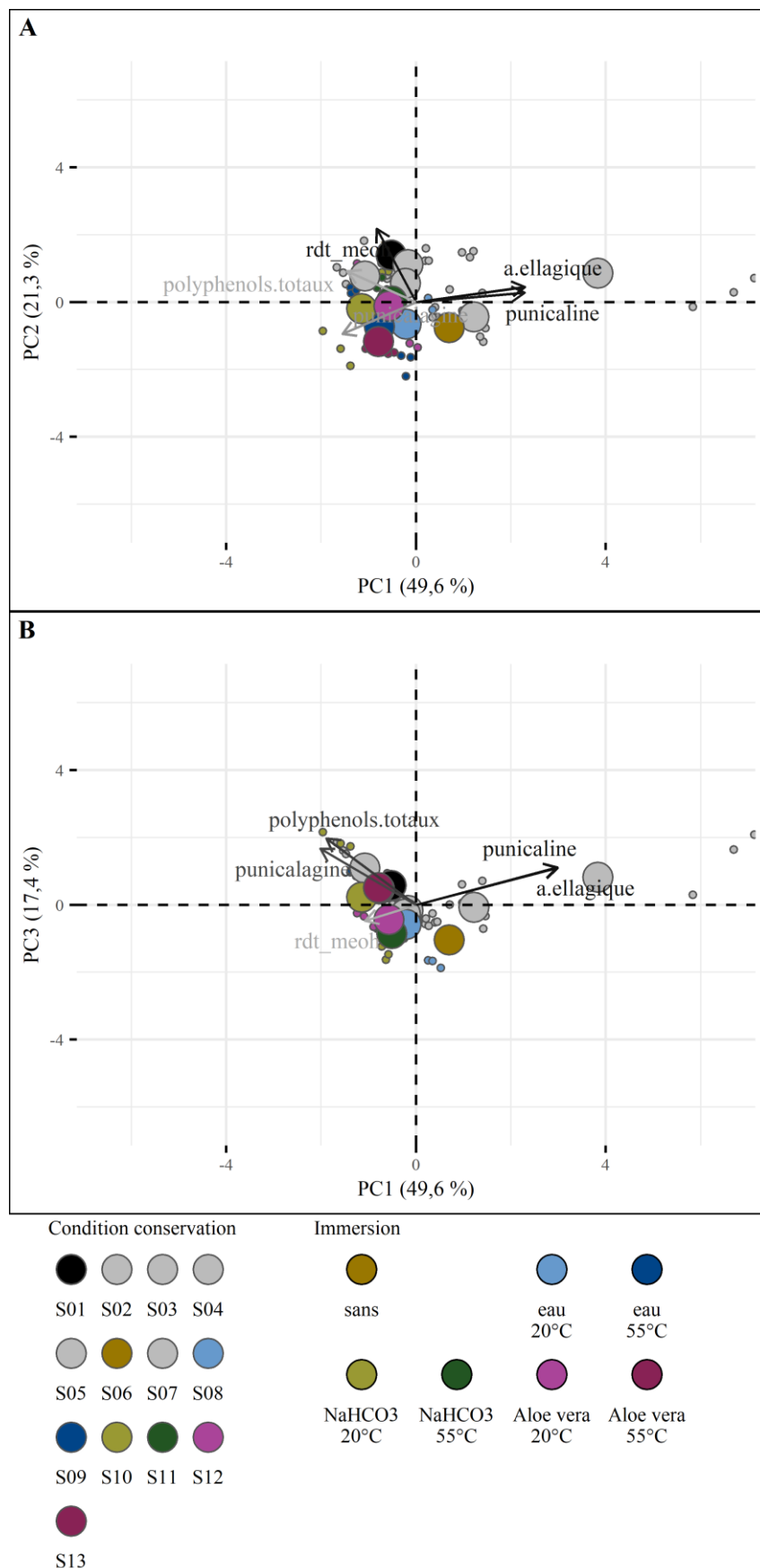


Figure 4.22 : **Effet de l'immersion avant la conservation des grenades Valenciana sur les teneurs en polyphénols de leurs péricarpes.** Représentation sur les plans formés par les composantes PC1,PC2 (A) et PC1,PC3 (B) des individus (échantillons analysés à 4 et 8 semaines, points), de leurs barycentres et de leurs variables (composés). La qualité de la représentation des composés (vecteurs) sur les plans est donnée par un indice croissant de gris à noir et les méthodes d'immersion sont représentées en couleur (n=6 pour les 7 conditions).

#### 4.2.1.e.v. Relation entre la composition moléculaire et les caractéristiques qualitatives des grenades Valenciana au cours de leur conservation

Afin de déterminer de potentielles causes aux variations de la composition des péricarpes de la variété Valenciana au cours de la conservation des grenades, les corrélations entre les composés quantifiés et les grandeurs qualitatives décrites précédemment ont été estimées. Le rendement en extractibles et les teneurs en polyphénols des péricarpes, ainsi que la masse relative à la masse initiale, la différence de couleur par rapport à la couleur initiale, et les altérations du péricarpe des grenades ont été moyennées toute condition de conservation confondue aux durées de 0, 4 et 8 semaines. La matrice des corrélations entre la composition chimique et les caractéristiques qualitatives des grenades Valenciana est présentée sur le tableau 4.13.

Concernant la composition chimique des péricarpes, la corrélation entre les teneurs en punicaline et en acide ellagique est forte ( $r=0,97$ ,  $p<0,05$ ) et significative, alors que le rendement en extractibles et les teneurs en polyphénols semblent évoluer indépendamment des autres teneurs ( $|r|<0,5$  ou  $p<0,05$ ). Ces relations sont en accord avec les observations établies précédemment.

En outre, des relations entre la masse relative ou la différence de couleur des grenades et le rendement en extractibles au méthanol ou la teneur en polyphénols totaux des péricarpes sont retrouvées mais inférieures au seuil ( $|r|<0,6$ ,  $p<0,05$ ). De la même manière, le taux d'altération physiologique ou microbienne est corrélé faiblement mais significativement ( $|r|<0,6$ ,  $p<0,05$ ) aux teneurs en punicalagine, punicaline et acide ellagique. Les deux autres taux représentant les altérations du péricarpe par craquelures et éclatement des grenades ne semblent pas de leur côté être en lien avec l'évolution de la composition des péricarpes.

En revanche, la différence de couleur des grenades évolue dans le même sens que les teneurs en punicaline et acide ellagique ( $r>0,5$ ,  $p<0,05$ ), et la corrélation est élevée avec la teneur en punicaline ( $r=0,7$ ). Cela suggère que plus la couleur des grenades varie au cours de leur conservation, plus la teneur en punicaline des péricarpes est élevée.

Précédemment nous avons montré d'une part que la conservation des grenades Valenciana de 0 à 8 semaines entraîne une augmentation de la teneur en punicaline de 1,0 à 1,7 mg/g ms ; la conservation à une humidité croissante de 63 à 92 % à 17 °C l'augmente de 3,0 à 6,3 mg/g ms ; la conservation à une température croissante de 4 à 17 °C à une humidité supérieure à 92 % l'augmente de 0,8 à 6,3 mg/g ms ; l'acclimatation n'induit pas de changement de celle-ci ; l'immersion avant la conservation la diminue de 0,8 à 0,6 mg/g ms ; et la méthode d'immersion n'influence pas celle-ci.

D'autre part, la différence de couleur des grenades Valenciana s'accroît au cours de la conservation de 0 à 8 et 15 (sans unité) les semaines 0, 4 et 8 ; est peu différente ou plus élevée (la première semaine de 4 à 7, la huitième semaine de 16 à 30) lorsque l'humidité varie de 63 à supérieure à 92 % à 17 °C ; s'accroît lorsque la température varie de 4 à 17 °C à humidité contrôlée (de 2-3 à 5-7 la première semaine, de 7 à 30 la huitième semaine) ; n'est pas différente lorsque les fruits ont été acclimatés ; et ne varie pas fortement lorsque les fruits ont été immergés.

Par conséquent, il semblerait que l'évolution de la couleur externe des grenades Valenciana soit similaire à celle de la teneur en punicaline de leurs péricarpes. Plus particulièrement, la durée de conservation et la température de conservation semblent engendrer les mêmes effets sur la teneur en punicaline et la variation de couleur des grenades Valenciana. Par conséquent, l'évolution de cette teneur pourrait être liée au changement de la couleur des grenades pendant leur conservation. Contrairement aux grenades Mollar de Elche, l'aspect morphologique des grenades Valenciana semble donc en partie lié à la composition des péricarpes.

Tableau 4.13 : Relation entre la composition moléculaire des péricarpes et la masse, la couleur et l'aspect des grenades Valenciana au cours de leur conservation (n=12 à 0, 4 et 8 semaines).

Composition ou Aspect	Rendement extractibles	Teneur polyphénols totaux	Teneur punicalagine	Teneur punicaline	Teneur acide ellagique	Masse relative	Différence couleur	Taux éclatement	Taux craquelure	Taux altération physiologique ou microbienne
Rendement extractibles (g/100g ms)	1,00	ns	ns	ns	ns	0,53	-0,57	ns	ns	ns
Teneur polyphénols totaux (mg eag/g ms)	ns	1,00	ns	ns	ns	0,48	-0,55	ns	ns	ns
Teneur punicalagine (mg/g ms)	ns	ns	1,00	-0,40	-0,45	ns	ns	ns	ns	-0,44
Teneur punicaline (mg/g ms)	ns	ns	-0,40	1,00	<b>0,97</b>	ns	<b>0,65</b>	ns	ns	0,54
Teneur acide ellagique (mg/g ms)	ns	ns	-0,45	<b>0,97</b>	1,00	ns	0,60	ns	ns	0,51
Masse relative à la masse initiale	0,53	0,48	ns	ns	ns	1,00	-0,47	ns	ns	ns
Différence de couleur à la couleur initiale	-0,57	-0,55	ns	<b>0,65</b>	0,60	-0,47	1,00	ns	ns	0,43
Taux d'éclatement (%)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1,00	0,59	ns
Taux de craquelure (%)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,59	1,00	ns
Taux d'altérations physiologique ou microbienne (%)	ns	ns	-0,44	0,54	0,51	ns	0,43	ns	ns	1,00

Les corrélations ont été produites avec la méthode de Pearson et seules les coefficients (r) de corrélations significatifs ( $p < 0,05$ ) sont affichés alors que les corrélations non significatives ( $p > 0,05$ ) sont représentées par "ns". Les coefficients élevés ( $|r| > 0,65$ ) sont mis en évidence en gras.

#### 4.2.1.f. Conditions optimales de conservation des grenades

L'étude de l'évolution de la composition chimique des péricarpes de grenades au cours de leur conservation a mis en lumière plusieurs phénomènes communs ou distincts entre les deux variétés étudiées.

Tout d'abord, la différence de composition initiale entre les péricarpes des grenades Mollar de Elche et Valenciana persiste et s'amplifie au cours de la conservation. La variété Mollar de Elche présente des teneurs en polyphénols totaux et punicalagine en moyenne 1,5 fois plus élevées que celles de Valenciana au cours de la conservation, alors que les grenades non conservées avaient une teneur en polyphénols totaux 1,25 fois plus élevées, et une teneur en punicalagine non significativement différente. A l'inverse, la variété Valenciana présente un rendement en extractibles et des teneurs en punicaline et acide ellagique en moyenne 1,1, 1,5 et 1,5 fois plus élevées respectivement au cours de sa conservation, alors qu'initialement ni le rendement en extractibles ni la teneur en punicaline n'étaient significativement différents et la teneur en acide ellagique 1,4 fois plus élevée. Malgré ces différences, la punicalagine est l'ellagitannin majoritaire des péricarpes des deux variétés, ce qui est en accord avec les résultats présentés dans le chapitre précédent sur les variétés Mollar de Elche et Provence.

Ensuite, au cours de la conservation, les teneurs en polyphénols totaux et punicalagine semblent évoluer de la même manière pour Mollar de Elche, celles en punicaline et acide ellagique pour Valenciana, et le rendement en extractibles semble indépendant des teneurs en polyphénols pour les deux variétés. Ces résultats rejoignent ceux du chapitre précédent concernant l'absence de lien entre le rendement en extractibles au méthanol et les polyphénols quantifiés dans les péricarpes de grenades. Néanmoins ils semblent aussi indiquer que la principale différence entre Mollar de Elche et Valenciana au cours de leur conservation réside dans les évolutions des teneurs en polyphénols totaux et punicalagine pour la première, et des teneurs en punicaline et acide ellagique pour la seconde.

De plus, l'étude des liens entre la composition des péricarpes de grenades des variétés Mollar de Elche et Valenciana et les caractéristiques morphologiques des fruits a mis en évidence des différences entre les deux variétés. Les changements majeurs des péricarpes des grenades Mollar de Elche résident dans les variations des teneurs en polyphénols totaux et en punicalagine qui ne semblent pas liées aux variations de masse, de couleur et aux taux de développement de micro-organismes, de craquelure et d'éclatement. En revanche, les changements composition chimique des péricarpes de la variété Valenciana reposent principalement sur les variations des teneurs en punicaline et acide ellagique qui semblent liées à l'aspect des grenades, en particulier aux variations de couleur.

Ces résultats sont cohérents avec l'étude de [382] portant sur 7 variétés (Wonderful PG101-2, PG102-3, PG1067, PG116-17, PG119-20, PG203-14, et EVE) conservées à 7 °C et 95 % d'humidité jusqu'à 6 mois, pour lesquelles les altérations de surface, la couleur, les teneurs en polyphénols et l'activité antioxydante des extraits de péricarpes évoluent de manière distincte au cours de la conservation.

Par exemple, les teneurs en polyphénols totaux et punicaline de la variété 101-2 ne varient pas significativement alors que celles de la variété EVE augmentent et diminuent, respectivement, au cours de la conservation. La dégradation de la première variété est faible alors que celle de la seconde est plus importante en termes de proportions de grenades atteintes par des déchirures de surface.

Cette étude a aussi montré pour trois variétés (PG106-7, PG102-3, EVE) que la teneur en punicaline et la couleur sont les paramètres principaux évoluant au cours de la conservation des grenades, ce qui rejoint nos résultats concernant la variété Valenciana. A notre connaissance, cette étude est la seule incluant l'effet variétal à l'effet de la conservation des grenades sur les aspects morphologiques et de composition moléculaire, mais d'autres ont porté sur des variétés de grenades spécifiques [212,215,377].

Dans une étude sur la variété Ganesh cultivée en Chine [377], la conservation à 2, 5 et 8 °C et 90-95 % d'humidité de 0 à 4 mois entraîne une diminution de la teneur en tannins totaux des grenades en lien avec une augmentation du changement de couleur. La même tendance a été observée pour la variété Wonderful cultivée en Afrique du Sud [215] et conservée à 5 ou 10 °C et 91 % d'humidité, de 0 à 6 mois. Bien que les corrélations ne soient pas importantes ou significatives, nos résultats sont en accord avec ces études car, d'une part, la couleur des grenades Mollar de Elche et Valenciana évolue au cours du temps, et, d'autre part, les teneurs en polyphénols totaux et punicalagine évoluent au cours de la conservation, dépendamment de la méthode employée et à différents degrés selon la variété. En plus de l'effet variétal, les conditions de conservation semblent aussi faire varier les relations entre l'aspect morphologique des grenades et la composition de leurs péricarpes.

La modification du rendement en extractibles pourrait impliquer que les teneurs en métabolites autres que les polyphénols présents dans les péricarpes et extraits par le méthanol diminuent lorsque les grenades sont conservées et de manière prédominante pour la variété Mollar de Elche. Cette diminution pourrait être due à leur détérioration par des phénomènes physiologiques du fruit ou par le développement de micro-organismes dans les péricarpes et non perceptibles à la surface des fruits.

De même, la modification des teneurs en polyphénols pourrait être liée au développement de micro-organismes ou à certaines activités enzymatiques (polyphénol oxydases). Pour rappel, une des propriétés majeures des polyphénols est leur capacité antioxydante, leur dégradation serait donc possible à partir d'un stress oxydant engendré par l'environnement de conservation des grenades. De plus les ellagitannins sont composés d'un groupement hexose (glucide) qui pourrait être ciblé par des micro-organismes.

L'influence des paramètres de conservation des grenades des deux variétés est résumée dans le tableau 4.14. Dans l'ensemble, les paramètres de conservation étudiés ont des effets dépendant de la variété (humidité et température de conservation, immersion) ou similaires entre les deux (durée). L'augmentation de l'humidité de conservation entraîne une accumulation des polyphénols évoluant principalement pour chaque variété, la punicalagine pour Mollar de Elche et la punicaline et l'acide ellagique pour Valenciana. Son effet pourrait donc être considéré comme similaire entre les deux variétés.



Tableau 4.14 : Effets principaux des paramètres de conservation des grenades Mollar de Elche et Valenciana sur la composition de leurs péricarpes.

<b>Paramètre conservation</b>	<b>Mollar de Elche</b>	<b>Valenciana</b>
Durée (de 0 à 8 semaines)	Diminution rendement	Diminution rendement
Humidité relative de 63 % à 103% à 17°C	Augmentation teneur punicalagine Augmentation rendement	Augmentation teneur punicalagine Augmentation teneur acide ellagique
Contenants hermétique à 4°C et 97-103 %	Diminution teneur punicalagine Augmentation rendement	
Température de 4 à 17°C à 103 %	Augmentation teneur punicalagine Diminution teneur polyphénols totaux	Augmentation teneur punicalagine Augmentation teneur acide ellagique
Acclimatation à 103 % (10 jours à 15°C puis 4°C)	Augmentation teneur punicalagine Augmentation teneur polyphénols totaux Diminution rendement	
Immersion dans eau 20°C		
Immersion dans eau 55°C	Diminution teneur polyphénols totaux Diminution teneur punicalagine	
Immersion dans bicarbonate de sodium 20°C	Diminution teneur polyphénols totaux Diminution teneur punicalagine	Augmentation rendement
Immersion dans bicarbonate de sodium 55°C		Augmentation rendement
Immersion dans <i>Aloe vera</i> 20°C		Augmentation rendement
Immersion dans <i>Aloe vera</i> 55°C	Diminution teneur polyphénols totaux Diminution teneur punicalagine	

Pour obtenir un rendement et des teneurs en polyphénols élevés, les grenades doivent préférentiellement être placées à une humidité relative élevée, avec un renouvellement d'air. Les deux variétés pourraient être plongées dans une solution de bicarbonate de sodium à 55 °C ou d'*Aloe vera* à 20 °C. L'augmentation de la température de conservation semble avoir des effets variables sur les deux variétés, une température intermédiaire entre 4 et 17 °C pourrait être plus adéquate.

Dans la partie précédente, nous avons montré que les conditions permettant de maintenir la qualité des grenades au cours de leur conservation sont une température de 4 °C, avec ou sans acclimatation à 15 °C pendant 10 jours, une humidité relative élevée et une circulation d'air, ainsi que l'immersion au préalable dans de l'eau froide (20 °C) ou chaude (55 °C) contenant du bicarbonate de sodium ou non.

La qualité des grenades et la composition moléculaire des péricarpes pourraient donc être préservées par la conservation à une humidité relative élevée et une circulation d'air ainsi qu'après une immersion dans une solution de bicarbonate de sodium à 55 °C. Les températures de 4 et 17 °C ne semblent pas adéquates au vu de leurs effets antagonistes, et une température intermédiaire devrait être sélectionnée.

## 4.2.2. Influence des conditions de conservation sur les lipides des co-produits de pressage des graines

### 4.2.2.a. Profil lipidique des co-produits de pressage des graines avant la conservation des grenades

La composition lipidique des co-produits de pressage des graines des grenades des variétés Mollar de Elche et Valenciana avant leur conservation est donnée dans le tableau 4.15.

Tableau 4.15 : Composition des co-produits de pressage des grenades Mollar de Elche et Valenciana avant leur conservation ( $n=10$  fruits). Les valeurs moyennes et les écart-types du rendement en huile et des teneurs relatives en acides gras sont donnés pour chaque lot de co-produits des variétés Mollar de Elche et Valenciana non conservées.

Composition	Mollar de Elche	Valenciana	p	p cor.(H)
<i>Durée conservation (semaine)</i>	<i>0</i>	<i>0</i>		
Rendement huile (g/100g ms)	11 ± 0	19 ± 1	0,009	0,098
Acide myristique C14:0 (%)	0,06 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,008	0,098
Acide palmitique C16:0 (%)	3,08 ± 0,06	3,00 ± 0,01	0,091	0,598
Acide palmitoléique C16:1n-7 (%)	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,008	0,098
Acide stéarique C18:0 (%)	1,79 ± 0,03	2,01 ± 0,02	<0,001	<b>0,009</b>
Acide oléique C18:1n-9 c (%)	3,73 ± 0,04	4,05 ± 0,03	<0,001	<b>0,006</b>
Acide linoléique C18:2n-6 c (%)	5,32 ± 0,02	5,66 ± 0,04	<0,001	<b>0,003</b>
Acide $\alpha$ -linoléique C18:3n-3 c (%)	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,38	0,84
Acide punicique C18:3n-5 c,t,c (%)	83,02 ± 0,24	82,84 ± 0,03	0,28	0,84
Acide catalpique C18:3n-5 t,t,c (%)	1,25 ± 0,08	0,97 ± 0,03	0,005	0,063
Acide $\beta$ -éléostéarique C18:3n-5 t,t,t (%)	0,92 ± 0,04	0,54 ± 0,02	<0,0001	<b>0,001</b>
Acide arachidique C20:0 (%)	0,41 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,41	0,84
Acide eicosénoïque C20:1n-9 c (%)	0,32 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,12	0,62
Acide béhénique C22:0 (%)	0,02 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,015	0,133
Acide lignocérique C24:0 (%)	0,05 ± 0,01	0,01 ± 0,02	0,024	0,192

Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  écart-type de l'analyse de deux échantillons pour le rendement en huile et de trois échantillons pour les teneurs relatives en acides gras. La significativité de la différence entre variétés est donnée par la p-valeur d'une analyse de la variance (seuil 5 %), puis ajustée avec la correction de Holm (p cor. (H)).

Les rendements en huile des co-produits de grenades sont de 11 et 19 % pour Mollar de Elche et Valenciana, respectivement. La différence entre les deux variétés n'est pas significative ( $p < 0,05$ ) bien qu'importante, probablement en raison du faible nombre de répétitions. Ces teneurs sont comprises dans l'intervalle de celles décrites dans le chapitre précédent pour les variétés Mollar de Elche et Provence, entre 13 et 27 %.

La teneur en acide punicique est de 83,0 et 82,8 % dans les co-produits de Mollar de Elche et Valenciana, respectivement. Cette teneur ne varie pas significativement ( $p < 0,05$ ) entre les deux variétés, et l'acide punicique est l'acide gras majoritaire des co-produits. Ces résultats sont aussi en accord avec les teneurs décrites dans le chapitre précédent, en particulier les teneurs relatives en acide punicique de Mollar de Elche étaient comprises entre 80,7 83,6 % selon l'origine des grenades.

Les isomères de l'acide punicique, les acides catalpique et  $\beta$ -éléostéarique, sont présents à hauteur de 1 % ou moins. L'écart de 0,4 % entre les teneurs en acide  $\beta$ -éléostéarique des deux variétés est significative ( $p < 0,05$ ) mais semble négligeable, alors que celui de 0,3 % entre les teneurs en acide catalpique n'est pas significatif. Les teneurs relatives en acides myristique, palmitoléique,  $\alpha$ -linoléique, eicosénoïque, béhénique et lignocérique sont aussi inférieures à 1 % dans les deux variétés et non significativement différentes entre Mollar de Elche et Valenciana ( $p > 0,05$ ).

Parmi les acides gras présents à plus de 1 %, la teneur relative en acide palmitique est de 3,1 et 3,0 % pour Mollar de Elche et Valenciana, respectivement, et aucune différence n'est détectée entre les variétés ( $p > 0,05$ ). Les teneurs relatives en acides stéarique, oléique et linoléique sont de 1,8, 3,7 et 5,3 % respectivement pour Mollar de Elche, et de 2,9, 4,1 et 5,7 % pour Valenciana. Ces teneurs sont significativement différentes entre les deux variétés, mais un écart de 1 % maximum est retrouvé, ce qui semble négligeable. Le profil en acides gras des deux variétés est proche de celui décrit dans les variétés Mollar de Elche et Provence dans le chapitre précédent, à la différence des isomères de l'acide punicique, dont la teneur est légèrement plus élevée.

Les rendements en huile et profils en acides gras des variétés Mollar de Elche et Valenciana semblent donc équivalents avant leur conservation, et l'acide punicique représente l'acide gras majoritaire des co-produits de pressage des graines.

#### **4.2.2.b. Composition lipidique des co-produits de pressage des graines pendant la conservation des grenades**

La composition lipidique des co-produits de pressage des grenades Mollar de Elche et Valenciana au cours de leur conservation est présentée dans le tableau **4.16**. Le rendement en huile ainsi que les teneurs en acides gras principaux, c'est-à-dire ceux présents à plus de 1 %, sont exposés par condition de conservation, "S01" pour les co-produits de grenades non conservées, et "S02"- "S13" pour les grenades conservées 4 ou 8 semaines dans les 12 conditions.

Le rendement en huile des grenades Mollar de Elche est compris entre 11 et 20 %, et celui de Valenciana entre 12 et 19 % sur l'ensemble des durées et conditions de conservation. Ces rendements sont significativement différents entre au moins deux conditions de conservation ( $p < 0,05$ ). Le rendement en huile des grenades Mollar de Elche semble plus faible avant la conservation, alors que celui des grenades Valenciana semble plus élevé.

Parmi les acides gras présents à une teneur relative supérieure à 1 %, l'acide punicique est largement majoritaire, avec une teneur relative de 80,5-83,5 et de 80,6-83,4 % pour les variétés Mollar de Elche et Valenciana, respectivement. Cette teneur varie significativement ( $p < 0,05$ ) entre les co-produits des différentes conditions avec un écart maximum de 3 % qui semble relativement faible.

Les teneurs relatives en acide palmitique, stéarique, oléique, linoléique, catalpique et  $\beta$ -éléostéarique sont de 2,9-3,4, 1,8-2,6, 3,5-4,5, 5,0-6,1, 1,0-1,4, et 0,6-1,1 % pour Mollar de Elche, et de 2,7-3,2, 1,9-2,2, 3,6-5,1, 5,4-6,3, 1,0-1,1, 0,5-0,8 % pour Valenciana, respectivement. Ces teneurs évoluent au cours de la

conservation ( $p < 0,05$ ), mais de la même manière que pour l'acide punicoïque, les variations semblent négligeables puisque comprises entre 0,3 et 1,6 %.

La conservation des grenades Mollar de Elche et Valenciana semble avoir un impact sur le rendement en huile des co-produits de pressage et leur profil lipidique, bien que dans l'ensemble la prévalence de chaque acide gras semble inchangée.

Tableau 4.16 : Composition lipidique des co-produits de pressage des graines au cours de la conservation des grenades. Seules les teneurs en acides gras supérieures à 1 % ont été sélectionnées.

Code conservation	Durée cons. (semaine)	Type im.	T im. (°C)	T cons. (°C)	RH cons. (%)	Rendement huile (g/100g ms)	Acide palmitique C16:0 (%)	Acide stéarique C18:0 (%)	Acide oléique C18:1n-9 c (%)	Acide linoléique C18:2n-6 c (%)	Acide punicoïque C18:3n-5 c,t,c (%)	Acide catalpique C18:3n-5 t,t,c (%)	Acide β-éléostéarique C18:3n-5 t,t,t (%)	
<b>Mollar de Elche</b>														
S01	0	-	-			11 ± 0	3,08 ± 0,06	1,79 ± 0,03	3,73 ± 0,04	5,32 ± 0,02	83,02 ± 0,24	1,25 ± 0,08	0,92 ± 0,04	
S02	4	-	-	17	63	12 ± 1	3,00 ± 0,07	1,93 ± 0,02	4,00 ± 0,01	5,79 ± 0,07	82,26 ± 0,21	1,24 ± 0,02	0,86 ± 0,07	
	8	-	-	17	63	13 ± 0	2,87 ± 0,03	1,81 ± 0,01	3,52 ± 0,03	5,45 ± 0,03	83,45 ± 0,14	1,18 ± 0,03	0,85 ± 0,06	
S03	4	-	-	17,1	103	12 ± 1	3,09 ± 0,01	1,87 ± 0,01	4,29 ± 0,06	6,08 ± 0,01	81,26 ± 0,43	1,38 ± 0,20	1,08 ± 0,23	
	8	-	-	17,1	103	12 ± 1	2,97 ± 0,06	1,87 ± 0,03	45 ± 0,03	5,94 ± 0,06	81,91 ± 0,31	1,32 ± 0,09	0,93 ± 0,08	
S04	4	-	-	3,7	97	13 ± 0	2,93 ± 0,02	1,78 ± 0,02	3,89 ± 0,02	5,37 ± 0,03	83,10 ± 0,07	1,20 ± 0,01	0,84 ± 0,01	
	8	-	-	3,7	97	14 ± 1	3,04 ± 0,04	1,96 ± 0,01	49 ± 0,09	5,43 ± 0,03	82,59 ± 0,10	1,14 ± 0,00	0,77 ± 0,05	
S05	4	-	-	4,3	103	13 ± 2	3,09 ± 0,04	1,98 ± 0,02	41 ± 0,02	5,57 ± 0,04	82,44 ± 0,12	1,16 ± 0,02	0,80 ± 0,04	
	8	-	-	4,3	103	12 ± 0	3,05 ± 0,02	1,91 ± 0,01	4,03 ± 0,04	5,62 ± 0,04	82,57 ± 0,09	1,11 ± 0,04	0,78 ± 0,01	
S06	4	-	-	7,1	77	15 ± 1	2,94 ± 0,01	1,93 ± 0,01	4,47 ± 0,01	5,87 ± 0,02	82,20 ± 0,04	0,97 ± 0,02	0,63 ± 0,02	
	8	-	-	7,1	77	14 ± 1	2,99 ± 0,01	1,90 ± 0,01	3,96 ± 0,01	5,59 ± 0,01	82,84 ± 0,08	1,06 ± 0,03	0,68 ± 0,02	
S07	4	-	-	15 puis 4	99 puis 104	14 ± 1	2,99 ± 0,03	2,15 ± 0,03	3,87 ± 0,02	5,52 ± 0,01	82,76 ± 0,16	1,05 ± 0,03	0,70 ± 0,05	
	8	-	-	15 puis 4	99 puis 104	16 ± 0	3,02 ± 0,02	2,08 ± 0,04	4,01 ± 0,02	5,63 ± 0,02	82,54 ± 0,12	1,06 ± 0,02	0,70 ± 0,03	
S08	4	eau	20°C	7,1	77	14 ± 1	3,15 ± 0,03	2,17 ± 0,04	4,25 ± 0,05	5,71 ± 0,05	81,86 ± 0,24	1,09 ± 0,06	0,74 ± 0,05	
	8	eau	20°C	7,1	77	13 ± 1	3,19 ± 0,05	2,28 ± 0,08	3,67 ± 0,03	5,48 ± 0,02	82,26 ± 0,09	1,22 ± 0,04	0,92 ± 0,03	
S09	4	eau	55°C	7,1	77	14 ± 1	3,27 ± 0,03	2,38 ± 0,07	4,08 ± 0,00	5,81 ± 0,02	81,49 ± 0,10	1,20 ± 0,03	0,91 ± 0,06	
	8	eau	55°C	7,1	77	16 ± 1	3,12 ± 0,04	2,31 ± 0,06	4,35 ± 0,01	5,75 ± 0,04	81,66 ± 0,22	1,11 ± 0,07	0,79 ± 0,07	
S10	4	NaHCO <sub>3</sub>	20°C	7,1	77	18 ± 1	3,23 ± 0,06	2,46 ± 0,07	4,09 ± 0,01	5,49 ± 0,04	81,55 ± 0,26	1,25 ± 0,04	0,93 ± 0,06	
	8	NaHCO <sub>3</sub>	20°C	7,1	77	17 ± 1	3,44 ± 0,07	2,57 ± 0,09	4,22 ± 0,05	6,01 ± 0,03	80,52 ± 0,25	1,27 ± 0,05	0,94 ± 0,05	
S11	4	NaHCO <sub>3</sub>	55°C	7,1	77	16 ± 0	3,10 ± 0,15	2,36 ± 0,13	4,09 ± 0,02	5,52 ± 0,06	81,96 ± 0,32	1,19 ± 0,04	0,82 ± 0,09	
	8	NaHCO <sub>3</sub>	55°C	7,1	77	17 ± 3	2,94 ± 0,01	2,31 ± 0,01	4,33 ± 0,04	5,57 ± 0,06	81,86 ± 0,11	1,18 ± 0,02	0,82 ± 0,01	
S12	4	<i>Aloe vera</i>	20°C	7,1	77	19 ± 2	2,98 ± 0,01	2,16 ± 0,06	3,82 ± 0,05	5,31 ± 0,05	82,84 ± 0,20	1,17 ± 0,05	0,83 ± 0,03	
	8	<i>Aloe vera</i>	20°C	7,1	77	17 ± 0	2,97 ± 0,05	2,19 ± 0,04	3,54 ± 0,02	5,00 ± 0,04	83,35 ± 0,12	1,19 ± 0,04	0,83 ± 0,04	
S13	4	<i>Aloe vera</i>	55°C	7,1	77	16 ± 1	2,96 ± 0,02	2,23 ± 0,03	4,23 ± 0,01	5,61 ± 0,02	82,13 ± 0,03	1,13 ± 0,02	0,75 ± 0,03	
	8	<i>Aloe vera</i>	55°C	7,1	77	20 ± 1	2,88 ± 0,04	2,16 ± 0,03	4,23 ± 0,06	5,42 ± 0,05	82,53 ± 0,22	1,14 ± 0,04	0,73 ± 0,05	
						p	2,4e-08	1,5e-18	6,5e-30	3,6e-38	5,8e-36	7,1e-24	1,4e-09	2,2e-09
						p cor.(H)	9,5e-08	1,7e-17	1,1e-28	6,9e-37	1,0e-34	1,1e-22	8,5e-09	1,1e-08

Les valeurs sont les moyennes ± écart-type de l'analyse de trois échantillons pour les acides gras et deux échantillons pour l'huile. La significativité de la différence entre variétés est donnée par la p-valeur d'une analyse de la variance (p), puis ajustée avec la correction de Holm (p cor. (H)). T : température, RH : humidité relative, im. : immersion, cons. : conservation, eau : eau distillée, NaHCO<sub>3</sub> : bicarbonate de sodium 10 g/L, *Aloe vera* 1 g/L

Tableau 4.16, suite.

Code conservation	Durée cons. (semaine)	Type im.	T im. (°C)	T cons. (°C)	RH cons. (%)	Rendement huile (g/100g ms)	Acide palmitique C16:0 (%)	Acide stéarique C18:0 (%)	Acide oléique C18:1n-9 c (%)	Acide linoléique C18:2n-6 c (%)	Acide punicoïque C18:3n-5 c,t,c (%)	Acide catalpique C18:3n-5 t,t,c (%)	Acide $\beta$ -éléostéarique C18:3n-5 t,t,t (%)
<b>Valenciana</b>													
S01	0	-	-			19 ± 1	3,00 ± 0,01	2,01 ± 0,02	4,05 ± 0,03	5,66 ± 0,04	82,84 ± 0,03	0,97 ± 0,03	0,54 ± 0,02
S02	4	-	-	17	63	14 ± 1	3,15 ± 0,02	2,11 ± 0,03	4,34 ± 0,02	6,00 ± 0,02	81,56 ± 0,01	1,15 ± 0,02	0,75 ± 0,03
	8	-	-	17	63	12 ± 2	3,16 ± 0,01	2,20 ± 0,01	4,34 ± 0,01	5,75 ± 0,02	81,62 ± 0,04	1,19 ± 0,03	0,80 ± 0,03
S03	4	-	-	17,1	103	15 ± 1	2,98 ± 0,02	2,14 ± 0,03	4,47 ± 0,01	5,86 ± 0,04	81,88 ± 0,12	1,04 ± 0,02	0,64 ± 0,01
	8	-	-	17,1	103	16 ± 0	3,08 ± 0,03	2,08 ± 0,06	4,44 ± 0,03	6,14 ± 0,03	81,51 ± 0,19	1,06 ± 0,06	0,70 ± 0,04
S04	4	-	-	3,7	97	13 ± 1	3,08 ± 0,07	2,08 ± 0,09	5,08 ± 0,03	6,32 ± 0,04	80,64 ± 0,40	1,10 ± 0,11	0,69 ± 0,09
	8	-	-	3,7	97	13 ± 1	3,13 ± 0,09	2,19 ± 0,10	4,64 ± 0,10	5,84 ± 0,03	81,37 ± 0,51	1,14 ± 0,08	0,73 ± 0,14
S05	4	-	-	4,3	103	14 ± 0	2,98 ± 0,02	2,11 ± 0,06	4,42 ± 0,03	5,75 ± 0,04	82,11 ± 0,06	1,03 ± 0,05	0,65 ± 0,05
	8	-	-	4,3	103	14 ± 0	3,15 ± 0,01	2,11 ± 0,05	4,07 ± 0,03	6,12 ± 0,04	81,85 ± 0,11	1,02 ± 0,06	0,65 ± 0,07
S06	4	-	-	7,1	77	14 ± 0	3,14 ± 0,11	2,15 ± 0,15	4,53 ± 0,03	6,26 ± 0,03	81,20 ± 0,43	1,05 ± 0,10	0,65 ± 0,11
	8	-	-	7,1	77	14 ± 0	2,94 ± 0,03	1,90 ± 0,04	4,00 ± 0,04	5,93 ± 0,06	82,48 ± 0,21	1,00 ± 0,04	0,69 ± 0,04
S07	4	-	-	15 puis 4	99 puis 104	14 ± 0	2,83 ± 0,04	1,94 ± 0,06	4,09 ± 0,01	5,72 ± 0,04	82,61 ± 0,17	1,04 ± 0,06	0,70 ± 0,02
	8	-	-	15 puis 4	99 puis 104	15 ± 1	2,81 ± 0,01	1,95 ± 0,01	4,44 ± 0,02	5,77 ± 0,03	82,28 ± 0,08	1,05 ± 0,03	0,66 ± 0,03
S08	4	eau	20°C	7,1	77	13 ± 1	2,90 ± 0,01	2,11 ± 0,04	3,75 ± 0,02	5,43 ± 0,03	82,85 ± 0,13	1,16 ± 0,05	0,78 ± 0,03
	8	eau	20°C	7,1	77	13 ± 0	2,91 ± 0,05	2,05 ± 0,09	4,41 ± 0,05	6,11 ± 0,09	81,47 ± 0,43	1,18 ± 0,07	0,81 ± 0,12
S09	4	eau	55°C	7,1	77	13 ± 0	2,84 ± 0,03	1,95 ± 0,06	4,48 ± 0,03	5,91 ± 0,09	81,93 ± 0,06	1,12 ± 0,04	0,72 ± 0,02
	8	eau	55°C	7,1	77	15 ± 0	2,94 ± 0,04	2,11 ± 0,08	5,14 ± 0,45	6,07 ± 0,08	80,86 ± 0,55	1,12 ± 0,08	0,70 ± 0,11
S10	4	NaHCO <sub>3</sub>	20°C	7,1	77	15 ± 1	2,80 ± 0,01	1,98 ± 0,05	4,05 ± 0,01	5,42 ± 0,05	83,07 ± 0,06	1,00 ± 0,02	0,62 ± 0,04
	8	NaHCO <sub>3</sub>	20°C	7,1	77	13 ± 1	2,98 ± 0,02	1,98 ± 0,02	3,65 ± 0,01	5,93 ± 0,00	82,53 ± 0,13	1,06 ± 0,05	0,77 ± 0,05
S11	4	NaHCO <sub>3</sub>	55°C	7,1	77	13 ± 1	2,79 ± 0,05	1,94 ± 0,13	3,57 ± 0,02	5,51 ± 0,05	83,41 ± 0,40	1,04 ± 0,08	0,68 ± 0,12
	8	NaHCO <sub>3</sub>	55°C	7,1	77	14 ± 1	2,79 ± 0,03	1,93 ± 0,05	4,02 ± 0,02	5,68 ± 0,04	82,87 ± 0,05	1,00 ± 0,02	0,65 ± 0,04
S12	4	<i>Aloe vera</i>	20°C	7,1	77	14 ± 0	2,74 ± 0,01	1,95 ± 0,02	4,09 ± 0,01	5,40 ± 0,06	83,03 ± 0,12	1,07 ± 0,04	0,66 ± 0,05
	8	<i>Aloe vera</i>	20°C	7,1	77	14 ± 0	2,85 ± 0,02	1,91 ± 0,04	3,74 ± 0,04	5,48 ± 0,07	83,23 ± 0,17	1,07 ± 0,02	0,71 ± 0,03
S13	4	<i>Aloe vera</i>	55°C	7,1	77	15 ± 1	2,85 ± 0,04	2,01 ± 0,07	4,05 ± 0,02	5,57 ± 0,02	82,57 ± 0,20	1,13 ± 0,01	0,75 ± 0,07
	8	<i>Aloe vera</i>	55°C	7,1	77	15 ± 0	2,89 ± 0,00	2,11 ± 0,00	4,41 ± 0,00	5,55 ± 0,00	82,18 ± 0,00	1,12 ± 0,00	0,70 ± 0,00
					p	2,7e-05	1,3e-22	5,9e-08	1,5e-26	6,6e-33	1,0e-20	7,5e-05	0,0054
					p cor.(H)	0,000247	1,8e-21	5,9e-07	2,4e-25	1,2e-31	1,3e-19	0,000603	0,0215

Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  écart-type de l'analyse de trois échantillons pour les acides gras et deux échantillons pour l'huile. La significativité de la différence entre variétés est donnée par la p-valeur d'une analyse de la variance (p), puis ajustée avec la correction de Holm (p cor. (H)). T : température, RH : humidité relative, im. : immersion, cons. : conservation, eau : eau distillée, NaHCO<sub>3</sub> : bicarbonate de sodium 10 g/L, *Aloe vera* 1 g/L

#### 4.2.2.c. Étude de la composition des co-produits de pressage des grenades Mollar de Elche et Valenciana pendant leur conservation par analyse multivariée

L'influence de la variété, la durée et la méthode de conservation (facteurs étudiés) sur la composition lipidique des co-produits de pressage (variables) a été établie par analyse en composantes principales (ACP). Le rendement en huile et les teneurs en acides gras principaux, les acides palmitique, stéarique oléique, linoléique, punicique, catalpique et  $\beta$ -éléostéarique ont été sélectionnées car représentent les principaux constituants de la fraction lipidique des co-produits de pressage.

L'importance de ces variables et des facteurs étudiés dans la représentation des écarts entre les échantillons de co-produits (n=3 par durée, condition de conservation, et variété) est présentée sur le tableau 4.17.

Tableau 4.17 : Variables (composition chimique) et facteurs interprétables (variété, condition et durée de conservation) de l'analyse en composante principale des échantillons de péricarpes des grenades Mollar de Elche et Valenciana. Les variables et facteurs interprétables sur chaque composante sélectionnée (PC1, PC2 et PC3) sont mis en évidence en gras.

Code variable		PC1 (40,0 %)	p (PC1)	PC2 (26,8 %)	p (PC2)	PC3 (17,5 %)	p (PC3)
<b>Variable</b>							
Rendement huile (g/100g ms)	huile	0,09	0,273	0,00	0,986	<b>0,87</b>	<b>&lt;0,0001</b>
Acide palmitique C16:0 (%)	c16_0	<b>0,80</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,22	0,008	0,12	0,138
Acide stéarique C18:0 (%)	c18_0	<b>0,66</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,12	0,145	0,60	<0,0001
Acide oléique C18:1n-9 c (%)	c18_1n_9	0,57	<0,0001	<b>-0,68</b>	<b>&lt;0,0001</b>	-0,07	0,377
Acide linoléique C18:2n-6 c (%)	c18_2n_6	0,59	<0,0001	-0,62	<0,0001	-0,35	<0,0001
Acide punicique C18:3n-5 c,t,c (%)	c18_3n_5_ctc	<b>-0,95</b>	<b>&lt;0,0001</b>	0,30	<0,0001	0,07	0,399
Acide catalpique C18:3n-5 t,t,c (%)	c18_3n_5_ttc	0,53	<0,0001	<b>0,73</b>	<b>&lt;0,0001</b>	-0,26	0,001
Acide $\beta$ -éléostéarique C18:3n-5 t,t,t (%)	c18_3n_5_ttt	0,50	<0,0001	<b>0,79</b>	<b>&lt;0,0001</b>	-0,25	0,002
<b>Facteur étudié</b>							
Condition conservation			<b>&lt;0,0001</b>	<b>&lt;0,0001</b>		<b>&lt;0,0001</b>	
Variété			0,082	<b>&lt;0,0001</b>		0,145	
Durée conservation (semaine)			0,171	0,552		0,971	

Les trois premières composantes (PC1, PC2, PC3) représentent plus de 85 % de la variabilité entre les échantillons de co-produits, avec des variances expliquées de 40,0 %, 26,8 % et 17,5 %, respectivement. Les variations entre les échantillons de co-produits sont par conséquent bien représentés sur ces trois composantes.

Ces variations résident principalement ( $r > 0,65$  et  $p < 0,05$ ) dans les teneurs en acides punicique (*c18\_3n\_5\_ctc*), palmitique (*c16\_0*) et stéarique (*c18\_0*) selon PC1, les teneurs en acides catalpique (*c18\_3n\_5\_ttc*),  $\beta$ -éléostéarique (*c18\_3n\_5\_ttt*) et oléique (*c18\_1n\_9*) selon PC2, et le rendement en huile (*huile*) selon PC3. En revanche, les variations de la teneur en acide linoléique (*c18\_2n\_6*) ne sont pas représentées fortement sur ces trois composantes.

Les relations entre ces composés sont présentées sur la figure **4.23**. Le rendement en huile (*huile*) semble varier indépendamment des acides gras, alors que les teneurs des acides catalpique (*c18\_3n\_5\_ttc*) et  $\beta$ -éléostéarique (*c18\_3n\_5\_ttt*); des acides palmitique (*c16\_0*) et stéarique (*c18\_0*); et des acides oléique (*c18\_1n\_9*) et linoléique (*c18\_2n\_6*) semblent corrélées fortement entre elles. En revanche, la teneur en acide punicique (*c18\_3n\_5\_ctc*) semble corrélée négativement à celles des autres acides gras, en particulier les acides palmitique, stéarique, oléique et linoléique.

Par conséquent, les teneurs des acides gras saturés, insaturés non conjugués et insaturés conjugués semblent proportionnelles par famille, et la teneur en acide punicique semble inversement proportionnelle à celles-ci.



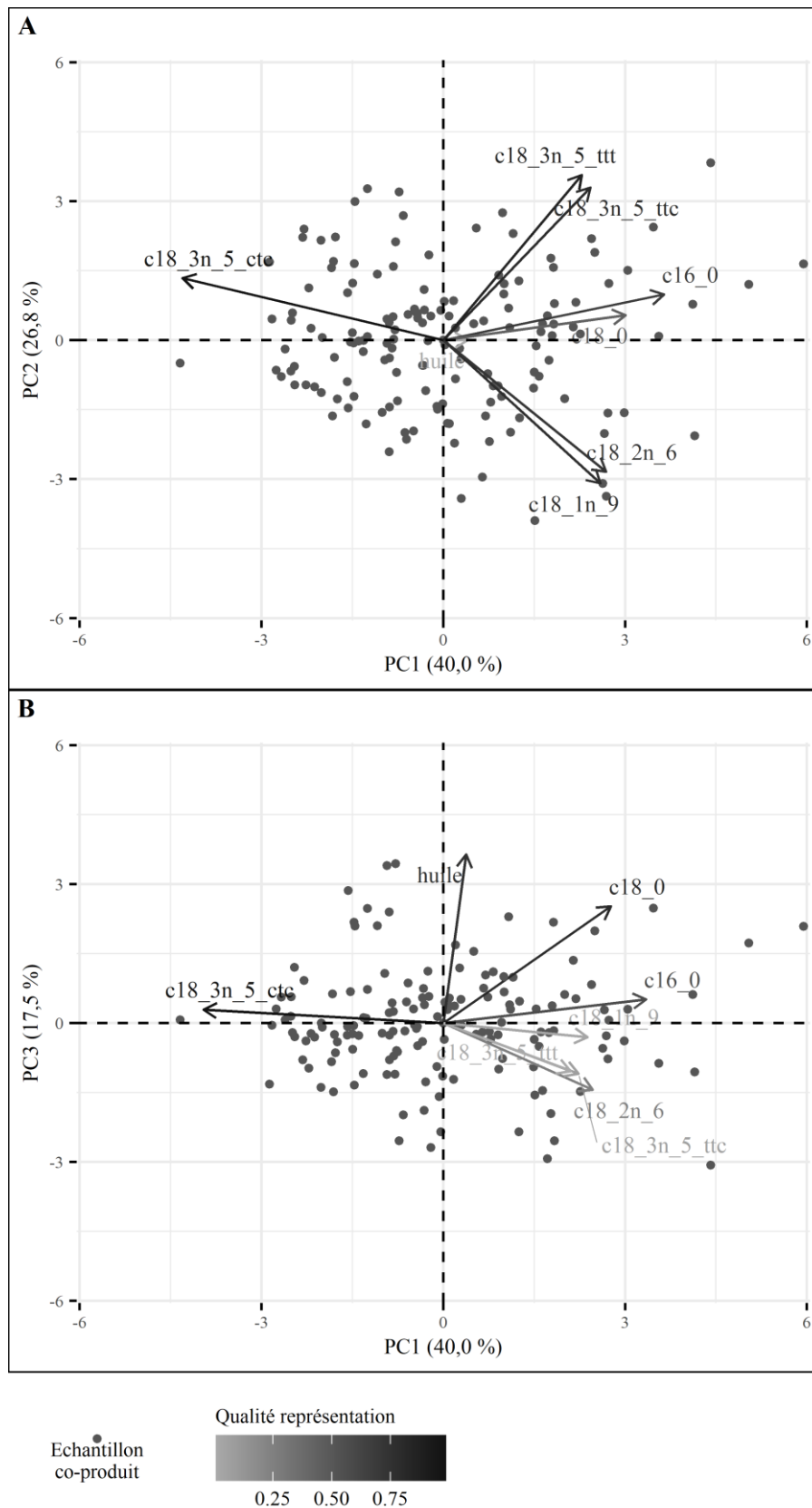


Figure 4.23 : Relations entre le rendement en huile et les teneurs relatives en acides gras des co-produits de pressage des grenades. Représentation sur les plans formés par les composantes PC1,PC2 (A) et PC1,PC3 (B) des individus (points, 50 échantillons, 3 répétitions) et de leurs variables (composés). La qualité de la représentation des composés (vecteurs) sur les plans est donnée par un indice croissant de gris à noir.

### 4.2.2.c.i. Effet de la variété de grenade

L'effet de la variété de grenade sur la composition des co-produits de pressage au cours de leur conservation est représenté sur la figure 4.24. Les échantillons de co-produits des deux variétés semblent se distinguer principalement par leurs teneurs en acides oléique (*c18\_1n\_9*), catalpique (*c18\_3n\_5\_ttc*) et  $\beta$ -éléostéarique (*c18\_3n\_5\_ttt*) (tableau 4.17).

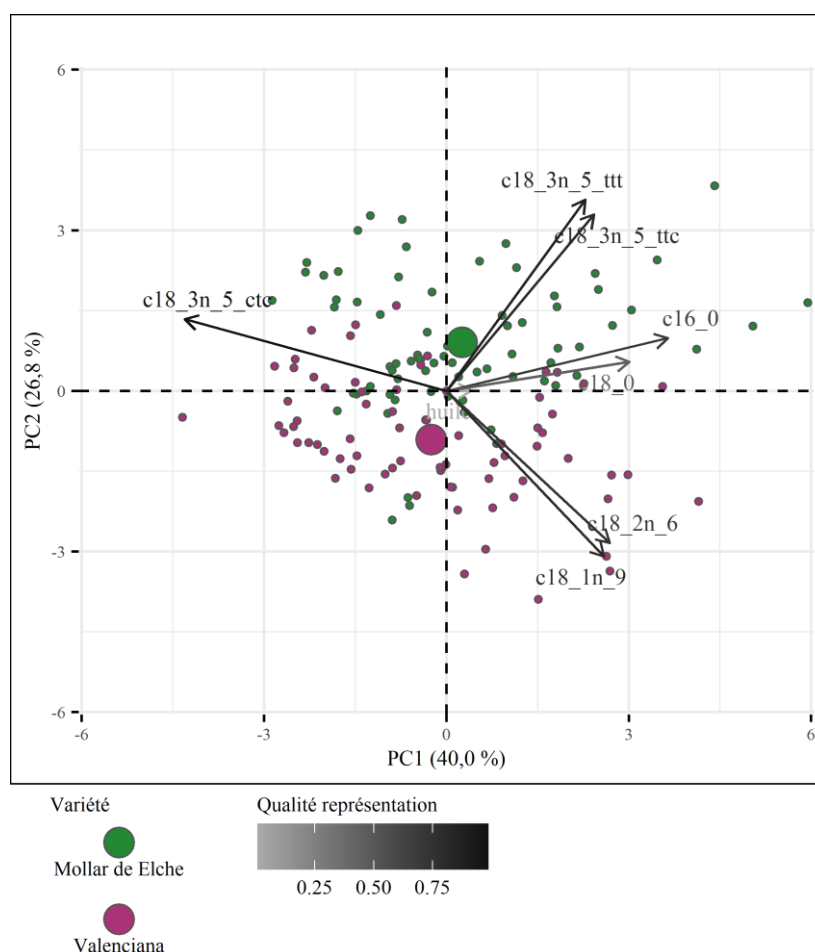


Figure 4.24 : Comparaison du rendement en huile et des teneurs en acides gras des co-produits de pressage des graines des grenades des variétés Mollar de Elche et Valenciana. Représentation sur les plans formés par les composantes PC1 et PC2 des individus (points), de leurs barycentres et de leurs variables (composés). La qualité de la représentation des composés (vecteurs) sur les plans est donnée par un indice croissant de gris à noir, et la variété est représentée en couleur, vert pour Mollar de Elche ( $n=75$ ) et violet pour Valenciana ( $n=75$ ).

Leurs teneurs respectives sont en moyenne de 4,1 %, 1,2 % et 0,8 % pour Mollar de Elche et de 4,3 %, 1,1 % et 0,7 % pour Valenciana. Les échantillons de co-produits de pressage de la variété Mollar de Elche semblent contenir de plus hautes teneurs de ces trois composés, mais des variations de l'ordre de 0,1 à 0,2 % sont retrouvées, ce qui semble négligeable. Le rendement en huile moyen des co-produits est de 15 % pour Mollar de Elche et 14 % pour Valenciana, et les teneurs relatives moyennes en acide palmitique, stéarique, linoléique, punicique sont respectivement de 3,1 % et 3,0 %, 2,1 et 2,0 %, 5,6 et 5,8 %, 82,3 et 82,2 % pour chaque variété.



5,7 %, 82,2 %, 1,1 % et 0,8 %, respectivement, pour les grenades conservées 4 et 8 semaines, et varient de moins de 0,1 % à 0,7 % avec les lots non conservés. En revanche, le rendement en huile des co-produits de grenades conservées 0, 4 et 8 semaines est de 14-15 %.

Par conséquent, la durée de conservation des grenades ne semble pas influencer ni le rendement, ni le profil lipidique des co-produits de pressage.

#### 4.2.2.c.iii. Effet des conditions de conservation

Contrairement à la variété et la durée de conservation, l'effet des conditions de conservation sur la composition des co-produits de pressage semble important (tableau 4.17) et affecter tous les composants ( $p(\text{PC1}, \text{PC2}, \text{PC3}) < 0,0001$ ). Comme précédemment, les effets de l'humidité, la température, et l'immersion des grenades seront traités séparément par la comparaison des conditions de conservation adéquates.

- **Effet de l'humidité**

L'effet de l'humidité de conservation des grenades sur la composition des co-produits de pressage est représenté sur la figure 4.26. Les conditions "S02" et "S03" permettent d'évaluer l'impact de l'augmentation de l'humidité (103 %) à 17 °C par rapport à l'humidité relative ambiante (63 %), et les conditions "S04" et "S05" l'impact de l'augmentation de l'humidité (103 %) à 17 °C par rapport à l'humidité relative ambiante de chambre froide (97 %). L'humidité relative de chambre froide étant proche de celle des contenants à humidité contrôlée, la comparaison des deux dernières conditions permet de juger de l'impact de la conservation dans des contenants hermétiques ("S05").

Les co-produits issus des grenades conservées à 17 °C et à 63 ou 103 % d'humidité semblent se distinguer principalement par les teneurs en acides gras. En effet, la teneur relative en acide punicique est en moyenne de 82,2 % dans la condition "S02", et de 81,6 % dans la condition "S03". Les teneurs en acides palmitique, stéarique, oléique, linoléique,  $\alpha$ -linoléique, catalpique et  $\beta$ -éléostéarique sont de 3,0 %, 2,0 %, 4,1-4,3 %, 5,8-6,0 %, 1,2 %, et 0,8 %, et le rendement en huile de 13-14 %. Les co-produits issus des grenades conservées à 17 °C et 63 % d'humidité ("S02") semblent donc contenir des teneurs en acide punicique plus élevées et légèrement plus faibles en acides linoléique et  $\alpha$ -linoléique, et un rendement en huile similaire à ceux obtenus après conservation des grenades à humidité élevée ("S03").

En revanche, les co-produits des grenades placées dans des contenants hermétiques ne semblent pas se différencier de ceux obtenus des grenades conservées à atmosphère ambiante de chambre froide. De fait, leur rendement en huile est identique (13 %), et leurs teneurs en acides gras varient de moins de 0,3 % entre les deux conditions.

L'humidité de conservation à 17 °C des grenades semble donc affecter faiblement la composition lipidique des co-produits de pressage. De la même manière, celle des co-produits de grenades placées dans des contenants hermétiques ou dans les conditions ambiantes de chambre froide à 4 °C semble similaire.

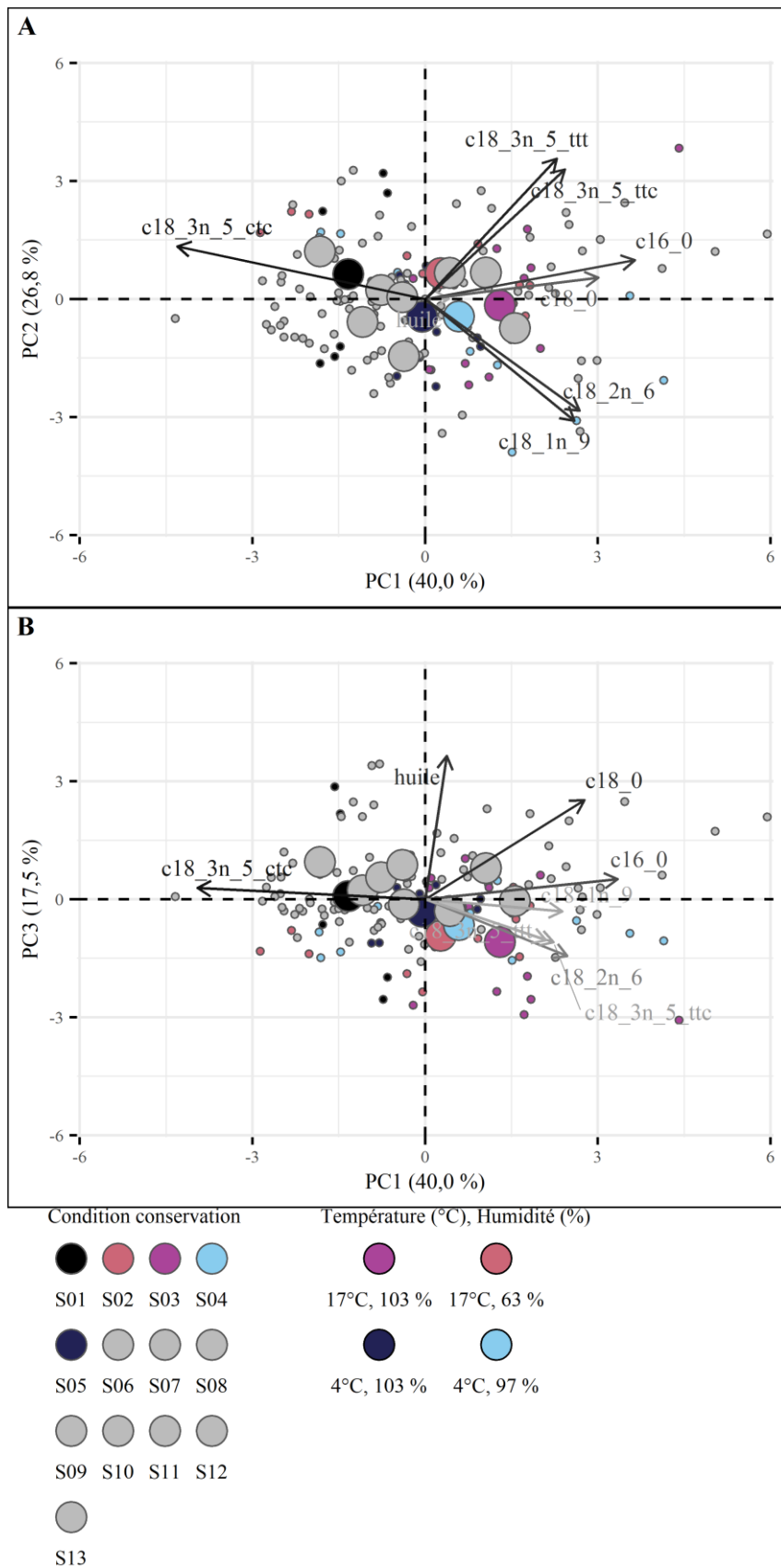


Figure 4.26 : Effet de l'humidité de conservation des grenades sur le rendement en huile et les teneurs en acides gras des co-produits de pressage des graines. Représentation sur les plans formés par les composantes PC1,PC2 (A) et PC1,PC3 (B) des individus (points), de leurs barycentres et de leurs variables (composés). La qualité de la représentation des composés (vecteurs) sur les plans est donnée par un indice croissant de gris à noir et les humidité relative de conservation sont représentées en couleur : 17°C, 63 % : rose (n=6) - 17°C, 103 % : magenta (n=6) - 4°C, 97 % : cyan (n=6) - 4°C, 103 % : bleu (n=6).

### • Effet de la température

Les conditions “S03” et “S05” permettent d'évaluer l'influence de la conservation à 17 °C et 4 °C, respectivement, et la condition “S07” l'impact de l'acclimatation des grenades à 15 °C avant leur conservation à 4 °C. Les échantillons de ces conditions sont représentés sur la figure 4.27.

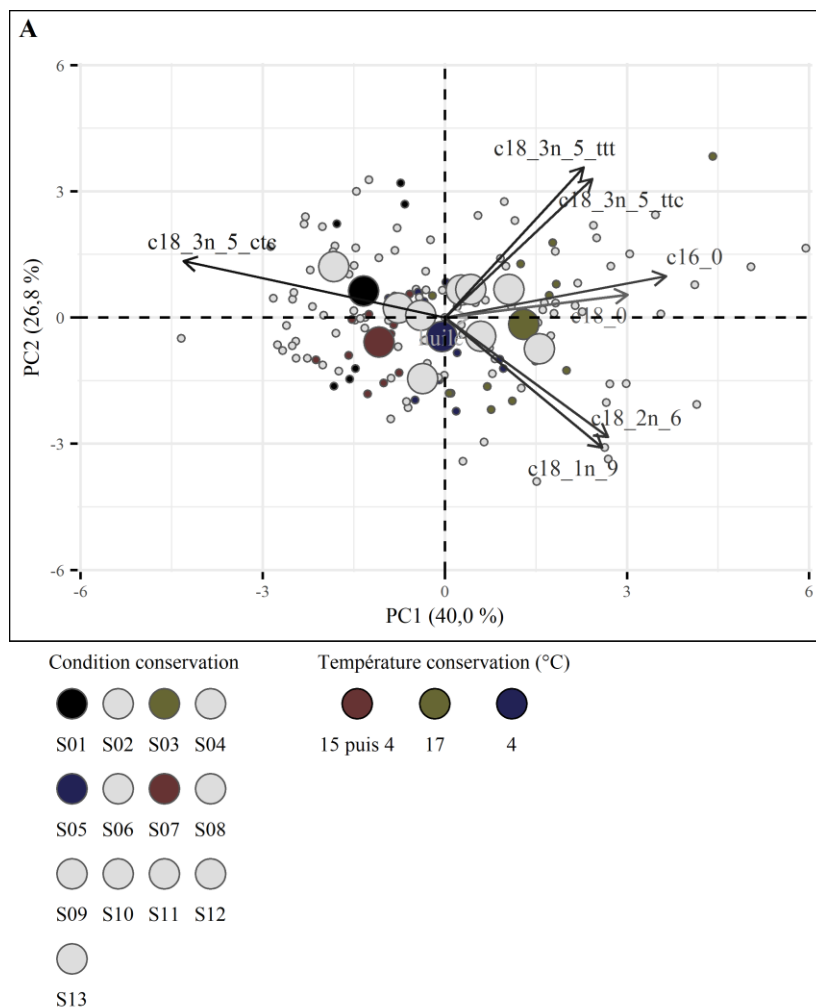


Figure 4.27 : Effet de la température de conservation des grenades sur le rendement en huile et les teneurs en acides gras des co-produits de pressage des graines. Représentation sur les plans formés par les composantes PC1, PC2 des individus (points), de leurs barycentres et de leurs variables (composés). La qualité de la représentation des composés (vecteurs) sur les plans est donnée par un indice croissant de gris à noir et les températures de conservation sont représentées en couleur : 15 puis 4 °C : rouge (n=6) - 17 °C : kaki (n=6) - 4 °C : bleu (n=6).

Les trois conditions semblent se différencier par le rendement en huile et les teneurs des différents acides gras, et les écarts semblent plus importants entre les conditions “S03” et “S07” qu’entre les conditions “S03” et “S05” ainsi que “S05” et “S07”.

La conservation à 17 °C entraîne un rendement en huile de 14 %, et des teneurs en acides palmitique, stéarique, oléique, linoléique, punicique, catalpique et  $\beta$ -éléostéarique de 3,0, 2,0, 4,3, 6,0, 81,6, 1,2 et 0,8 %. Diminuer la température à 4 °C semble montrer une diminution de 1 % du rendement en huile et de 0,1-0,2 % des teneurs en acides linoléique, catalpique et  $\beta$ -éléostéarique ; une augmentation de 0,6 %

de la teneur en acide punicique ; et moins de 0,1 % d'écart des teneurs en acides gras saturés. Le profil d'acides gras des co-produits de grenades acclimatées ("S07") montre un écart maximum de +0,3 % pour la teneur en acide punicique, de -0,2 % pour la teneur en acide palmitique et de 0,1 % ou moins pour les autres acides gras, et le rendement en huile est 1 % plus élevé que celui des grenades non acclimatées.

Les co-produits des grenades conservées à 17 °C montrent principalement une teneur plus faible en acide punicique que ceux de grenades placées à 4 °C, et l'acclimatation à 15 °C semble augmenter légèrement cette teneur. La température de conservation semble donc avoir une influence limitée sur les lipides des co-produits de pressage.

- **Effet de l'immersion**

L'effet de l'immersion des grenades dans de l'eau à 20 ("S08") ou 55 °C ("S09"), une solution de bicarbonate de sodium à 20 ("S10") ou 55 °C ("S11"), ou une solution d'*Aloe vera* à 20 ("S12") ou 55 °C ("S13") sur la composition lipidique des co-produits de pressage peut être évalué par comparaison avec les grenades non immergées mais conservées à une température et humidité relative identiques ("S06"). Les échantillons de co-produits analysés sont représentés par ces 7 conditions sur la figure 4.28.

La condition témoin ("S06") se distingue des autres conditions essentiellement par des teneurs en acides catalpique et  $\beta$ -éléostéarique plus faibles. Ces acides gras représentent 1,0 % et 0,7 % des co-produits des grenades témoins, et une diminution de 0,1 % est observée par rapport aux co-produits des grenades immergées, qui semble donc négligeable. Les conditions témoins ("S06"), "S08" et "S09" semblent produire des co-produits avec une teneur en huile plus faible que les autres conditions. En effet, elle est en moyenne de 14 % dans ces conditions et de 16 % dans les 4 autres conditions ("S10", "S11", "S12", "S13"). Par conséquent, il semblerait que plonger les grenades dans une solution de bicarbonate de sodium ou d'*Aloe vera* à 20 ou 55 °C pourrait augmenter de 2 % de rendement en huile des co-produits de pressage. Les co-produits des grenades des lots témoins et immergés dans de l'eau à 55 °C ("S09") semblent contenir des teneurs en acides oléique et linoléique plus élevées que les autres lots. Les écarts sont faibles car de 0,3 et 0,2 % pour les deux composés, en moyenne.

Les variations des teneurs en acide punicique semblent permettre la distinction des grenades conservées dans les conditions "S09" et "S10" avec des teneurs faibles, de celles conservées dans la condition "S12", avec des teneurs élevées, de celles des autres conditions, dont le témoin, avec des teneurs moyennes. Par rapport au témoin sans immersion, les teneurs en acide punicique varient de -0,7 % à +1,0 %. Par conséquent, l'immersion dans de l'eau à 55 °C ("S09") ou une solution de bicarbonate de sodium à 20 °C ("S10") semble diminuer la teneur relative en acide punicique, alors que l'immersion dans une solution d'*Aloe vera* à 20 °C ("S12") semble l'augmenter.

L'immersion des grenades avant leur conservation à 7 °C et 80 % d'humidité semble principalement affecter le rendement en huile et la teneur en acide punicique des co-produits de pressage. Le premier est affecté positivement par l'immersion dans une solution de bicarbonate de sodium ou d'*Aloe vera* à 20 ou 55 °C, et la seconde par une solution d'*Aloe vera* à 20 °C ("S12"). L'immersion des grenades dans une solution d'*Aloe vera* à 20 °C semble produire des co-produits avec des teneurs plus élevées en huile et en acide punicique.

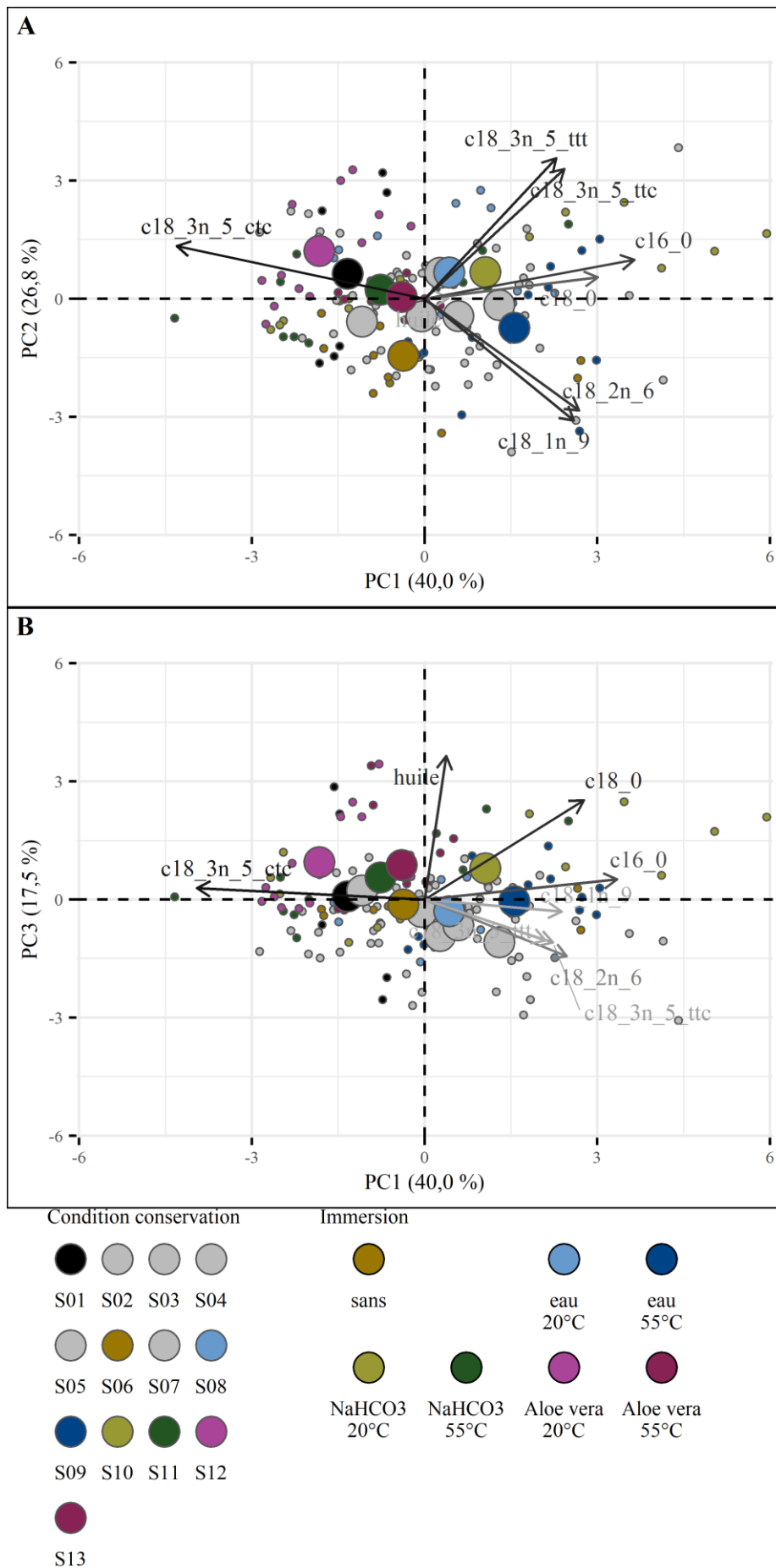


Figure 4.28 : Effet de l'immersion des grenades avant leur conservation sur le rendement en huile et les teneurs en acides gras des co-produits de pressage des graines. Représentation sur les plans formés par les composantes PC1,PC2 (A) et PC1,PC3 (B) des individus (points), de leurs barycentres et de leurs variables (composés). La qualité de la représentation des composés (vecteurs) sur les plans est donnée par un indice croissant de gris à noir et les méthodes d'immersion sont représentées en couleur (n=6 pour les 7 conditions).



#### 4.2.2.c.iv. Liens entre la qualité des grenades et les composés principaux des co-produits de pressage des graines

Les relations entre la composition chimique des co-produits de pressage des graines et les caractéristiques qualitatives des fruits pendant leur conservation sont présentées sur les tableaux 4.18 et 4.19. Le rendement en huile et les teneurs en acides gras supérieures à 1 % ont été moyennées aux semaines 0, 4 et 8 toute condition de conservation confondue. La masse relative à la masse initiale, la différence de couleur à la couleur initiale et les taux d'altérations du péricarpe d'origine physiologique ou microbienne, par craquement ou par éclatement ont aussi été moyennés toute condition de conservation confondue après 0, 4 et 8 semaines de conservation. Malgré des compositions lipidiques proches, les corrélations ont été conduites séparément pour les deux variétés car la qualité des fruits est affectée de manière différenciée entre les deux variétés.

Pour Mollar de Elche, la masse relative et la différence de couleur des grenades ne semblent liées à aucun composé des co-produits de pressage quantifié. Le taux de craquelure est faiblement corrélé positivement ( $r=0,5$ ,  $p<0,05$ ) à la teneur en acide linoléique, et le taux d'altérations d'origine physiologique ou microbienne l'est faiblement ( $r=0,4-0,6$ ,  $p<0,05$ ) au rendement en huile et à la teneur en acide stéarique. Ce taux est aussi faiblement négativement corrélé ( $r=-0,4$ ,  $p<0,05$ ) à la teneur en acide punicique. Pour Valenciana, seule la masse relative des grenades pourrait être liée à une diminution des teneurs en acides catalpique et  $\beta$ -éléostéarique, mais ces corrélations sont faibles ( $r=-0,6$  -  $-0,5$ ,  $p<0,05$ ).

Les résultats semblent indiquer que ni la composition des co-produits des grenades Mollar de Elche, ni celle des grenades Valenciana, ne sont fortement corrélées aux observations qualitatives du fruit entier.

Tableau 4.18 : Relation entre la composition moléculaire des péricarpes et la masse, la couleur et l'aspect des grenades Mollar de Elche au cours de leur conservation (n=12 à 0, 4 et 8 semaines).

Composition ou Aspect	Rendement huile	Acide palmitique C16:0	Acide stéarique C18:0	Acide oléique C18:1n-9	Acide linoléique C18:2n-6	Acide punicique C18:3n-5 c,t,c	Acide catalpique C18:3n-5 t,t,c	Acide β-éléostéarique C18:3n-5 t,t,t	Masse relative	Différence couleur	Taux éclatement	Taux craquelure	Taux altération physiologique ou microbienne (%)
Rendement huile (g/100g ms)	1,00	ns	0,63	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,44
Acide palmitique C16:0 (%)	ns	1,00	0,62	ns	ns	<b>-0,73</b>	ns	0,46	ns	ns	ns	ns	ns
Acide stéarique C18:0 (%)	0,63	0,62	1,00	ns	ns	-0,60	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,58
Acide oléique C18:1n-9 (%)	ns	ns	ns	1,00	<b>0,67</b>	<b>-0,69</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Acide linoléique C18:2n-6 (%)	ns	ns	ns	<b>0,67</b>	1,00	<b>-0,77</b>	ns	ns	ns	ns	ns	0,45	ns
Acide punicique C18:3n-5 c,t,c (%)	ns	<b>-0,73</b>	-0,60	<b>-0,69</b>	<b>-0,77</b>	1,00	ns	-0,41	ns	ns	ns	ns	-0,43
Acide catalpique C18:3n-5 t,t,c (%)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1,00	<b>0,96</b>	ns	ns	ns	ns	ns
Acide β-éléostéarique C18:3n-5 t,t,t (%)	ns	0,46	ns	ns	ns	-0,41	<b>0,96</b>	1,00	ns	ns	ns	ns	ns
Masse relative à la masse initiale	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1,00	-0,64	ns	ns	ns
Différence de couleur à la couleur initiale	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0,64	1,00	ns	ns	ns
Taux d'éclatement (%)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Taux de craquelure (%)	ns	ns	ns	ns	0,45	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1,00	ns
Taux d'altérations physiologique ou microbienne (%)	0,44	ns	0,58	ns	ns	-0,43	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1,00

Les corrélations ont été produites avec la méthode de Pearson et seules les coefficients (r) de corrélations significatifs ( $p < 0,05$ ) sont affichés alors que les corrélations non significatives ( $p > 0,05$ ) sont représentées par "ns". Les coefficients élevés ( $|r| > 0,65$ ) sont mis en évidence en gras.

Tableau 4.19 : Relation entre la composition moléculaire des péricarpes et la masse, la couleur et l'aspect des grenades Valenciana au cours de leur conservation (n=12 à 0, 4 et 8 semaines).

Composition ou Aspect	Rendement huile	Acide palmitique C16:0	Acide stéarique C18:0	Acide oléique C18:1n-9	Acide linoléique C18:2n-6	Acide punicique C18:3n-5 c,t,c	Acide catalpique C18:3n-5 t,t,c	Acide β-élostéarique C18:3n-5 t,t,t	Masse relative	Différence couleur	Taux éclatement	Taux craquelure	Taux altération physiologique ou microbienne
Rendement huile (g/100g ms)	1,00	ns	ns	ns	ns	ns	-0,50	<b>-0,70</b>	ns	ns	ns	ns	ns
Acide palmitique C16:0 (%)	ns	1,00	<b>0,77</b>	0,40	<b>0,68</b>	<b>-0,70</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Acide stéarique C18:0 (%)	ns	<b>0,77</b>	1,00	0,53	ns	<b>-0,69</b>	0,49	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Acide oléique C18:1n-9 (%)	ns	0,40	0,53	1,00	<b>0,62</b>	<b>-0,88</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Acide linoléique C18:2n-6 (%)	ns	<b>0,68</b>	ns	<b>0,62</b>	1,00	<b>-0,85</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Acide punicique C18:3n-5 c,t,c (%)	ns	<b>-0,70</b>	<b>-0,69</b>	<b>-0,88</b>	<b>-0,85</b>	1,00	-0,44	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Acide catalpique C18:3n-5 t,t,c (%)	-0,50	ns	0,49	ns	ns	-0,44	1,00	<b>0,85</b>	0,53	ns	ns	ns	ns
Acide β-élostéarique C18:3n-5 t,t,t (%)	<b>-0,70</b>	ns	ns	ns	ns	ns	<b>0,85</b>	1,00	0,60	ns	ns	ns	ns
Masse relative à la masse initiale	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0,53	-0,60	1,00	0,47	ns	ns	ns
Différence de couleur à la couleur initiale	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,47	1,00	ns	ns	0,43
Taux d'éclatement (%)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	1,00	0,59	ns
Taux de craquelure (%)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,59	1,00	ns
Taux d'altérations physiologique ou microbienne (%)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,43	ns	ns	1,00

Les corrélations ont été produites avec la méthode de Pearson et seules les coefficients (r) de corrélations significatifs (p<0,05) sont affichés alors que les corrélations non significatives (p>0,05) sont représentées par "ns". Les coefficients élevés (|r|>0,65) sont mis en évidence en gras.

#### 4.2.2.d. Conditions de conservation des grenades optimales pour la préservation des lipides

L'étude de l'effet des conditions de conservation des grenades sur la composition lipidique des co-produits de pressage a montré que les deux variétés de grenades ont des compositions proches. Le rendement en huile est en moyenne de 15 % et le profil d'acides gras est dominé par l'acide punicique à plus de 80 % des acides gras totaux.

La durée de conservation de 0 à 8 semaines, l'augmentation de l'humidité de conservation de 63 à 103 %, et la conservation dans des contenants hermétiques plutôt qu'à atmosphère ambiante ne semblent pas influencer les teneurs en lipides des co-produits. En revanche, la température de conservation pourrait affecter la teneur en acide punicique, notamment une légère diminution de cette teneur lorsque les grenades sont placées à 17 °C plutôt qu'à 4 °C, et une légère augmentation si les grenades sont acclimatées avant d'être placées à 4 °C. L'immersion des grenades dans une solution d'*Aloe vera* (20 °C) semble avoir un effet bénéfique sur le rendement en huile des co-produits, qui pourrait augmenter de 2 %, et sur la teneur en acide punicique, qui pourrait augmenter de 1 %.

Les conditions de conservation semblant optimales pour maximiser les lipides des co-produits de pressage des graines semblent donc être à 4 °C et humidité élevée, avec ou sans contenant hermétique, après avoir plongé les grenades dans une solution d'*Aloe vera* à 20 °C et les avoir acclimatées pendant 10 jours à 15 °C.

### 4.3. Conclusion

Les effets de la durée, de l'humidité et de la température de conservation ainsi que de l'immersion des grenades ont pu être établis grâce à un suivi jusqu'à 8 semaines dans les 12 modalités choisies. La durée de conservation affecte la masse, la couleur et le rendement en extractibles des péricarpes de grenades. Plus elle augmente, plus la qualité des fruits diminue, mais le rendement en extractibles des péricarpes augmente.

L'humidité de conservation de 63 à 103 % à 17 °C semble limiter la perte de masse des grenades, augmenter le changement de couleur des grenades Valenciana, entraîner une accumulation de punicaline et d'acide ellagique dans les péricarpes de Valenciana et une élévation de la teneur en punicalagine et du rendement en extractibles dans les péricarpes de Mollar de Elche.

L'augmentation de la température de 4 °C à 17 °C à une humidité supérieure à 92 % affecte les deux variétés de manière très distincte. Les grenades Mollar de Elche semblent présenter des masses inchangées, un changement de couleur plus important, une teneur en punicalagine plus importante mais en polyphénols totaux plus faible dans les péricarpes. En revanche les grenades Valenciana ont une perte de masse et un changement de couleur plus importants, des teneurs en acide ellagique et punicaline plus importantes dans les péricarpes. Pour les deux variétés, le rendement en huile des co-produits de pressage et la teneur relative en acide punicique varient de moins de 1 %.

L'acclimatation à 15 °C pendant 10 jours avant la conservation à 4 °C ne semble pas impacter la masse des grenades, leur couleur, la composition des péricarpes de

Valenciana, et semble augmenter de moins de 1 % la teneur en acide punicique des co-produits de pressage des deux variétés. La composition en polyphénols des péricarpes de Mollar de Elche varie avec de faibles augmentations des teneurs en polyphénols totaux et punicalagine.

L'immersion des grenades dans de l'eau chaude, du bicarbonate de sodium ou de l'*Aloe vera* pourrait retarder la perte de masse des grenades, mais ne semble pas affecter leur couleur. L'immersion dans de l'eau à 20 °C, une solution de bicarbonate de sodium à 20 °C ou d'*Aloe vera* à 55 °C permet de maintenir les teneurs en polyphénols des péricarpes Mollar de Elche au niveau des lots non traités. Pour la variété Valenciana, le rendement en extractibles des péricarpes semble augmenter lorsque les grenades sont plongées dans une solution de bicarbonate de sodium à 20 ou 55 °C, ou une solution d'*Aloe vera* à 20 °C. Le rendement en huile et la teneur en acide punicique des co-produits de pressage des graines semble augmenter de 2 % lorsque les grenades sont immergées dans une solution d'*Aloe vera* à 20 °C.

Les conditions de conservation des grenades optimales au regard de leurs caractéristiques qualitatives semblent être une température de 4 °C, avec ou sans acclimatation à 15 °C pendant 10 jours, une humidité relative élevée et une circulation d'air, ainsi que l'immersion au préalable dans de l'eau froide (20 °C) ou chaude (55 °C) contenant du bicarbonate de sodium ou non. En ce qui concerne la conservation des polyphénols des péricarpes, les grenades doivent préférentiellement être placées à une humidité relative élevée, avec un renouvellement d'air. Les deux variétés pourraient être plongées dans une solution de bicarbonate de sodium à 55 °C ou d'*Aloe vera* à 20 °C. L'augmentation de la température de conservation semble avoir des effets variables sur les deux variétés, une température intermédiaire entre 4 et 17 °C pourrait être plus adéquate. Finalement, les conditions intéressantes pour conserver les lipides des co-produits de pressage des graines semblent être une température de 4 °C et une humidité relative élevée, avec ou sans contenant hermétique, après avoir plongé les grenades dans une solution d'*Aloe vera* à 20 °C et les avoir acclimatées pendant 10 jours à 15 °C.

**5. ÉTUDE DE L'IMPACT DU  
CONDITIONNEMENT DES CO-PRODUITS  
SUR LA TENEUR EN COMPOSES A VALEUR  
AJOUTEE**



L'objectif de ce chapitre est d'évaluer l'influence de méthodes de conditionnement des co-produits de transformation des grenades sur les composés à valeur ajoutée qu'ils contiennent. Cette première étude sur les co-produits générés sur le territoire permettra d'apporter des connaissances pour la construction de nouvelles voies de valorisations. Après la culture, la récolte et la conservation, la phase suivante est la transformation des grenades en jus, et la génération des co-produits de pressage. Ces co-produits sont actuellement transférés pour leur valorisation de premier niveau (compost, épandage) au fur et à mesure de leur production. L'établissement de nouvelles voies de valorisation nécessite cependant une étape supplémentaire de conditionnement pour stabiliser les co-produits et leurs composés à valeur ajoutée.

Dans le secteur agroalimentaire, le développement de micro-organismes est une des causes de la détérioration nutritionnelle et organoleptique des denrées dans le temps [227]. Ces pertes peuvent être limitées par le conditionnement et la conservation en milieu contrôlé, et concernent les fruits comme leurs co-produits [383]. La méthode de conditionnement la plus courante est la déshydratation, ou le séchage, qui réduit l'humidité dans la matrice végétale la rendant inhospitalière pour les micro-organismes [384]. Le séchage peut être combiné à des traitements (additifs, ozone, irradiation) pour augmenter la durée de préservation [384]. La congélation, la surgélation ou la conservation à des températures basses ou négatives ralentissent aussi la dégradation de la matière mais pour une durée plus limitée que la déshydratation.

Deux méthodes de conditionnement ont été étudiées, l'ensilage et le séchage, pour leur facilité de mise en œuvre et leur technicité adaptée à une filière en émergence.

Comme décrit dans le chapitre 1, l'ensilage est une méthode de conditionnement de la matière végétale utilisée largement par les éleveurs et agriculteurs pour conserver leurs fourrages. La fermentation anaérobie spontanée sous-jacente peut avoir un impact sur certains composés de la matière. L'évolution des lipides et polyphénols des co-produits de grenade au cours de leur fermentation spontanée n'a été que marginalement étudiée dans la littérature, les travaux étant principalement centrés sur l'intérêt des co-produits de grenade ensilés dans l'alimentation animale [385–389]. Les travaux présentés dans ce chapitre portent donc sur l'étude de l'effet de la fermentation spontanée (ensilage) sur les polyphénols et lipides des co-produits de grenade afin d'évaluer l'intérêt de ce procédé pour leur valorisation. Ces travaux seront présentés dans une première partie sous la forme d'un article intitulé *Changes occurring in spontaneous fermentation of pomegranate transformation byproducts: case of pericarp phenolics and seed pomace lipids* en cours de publication dans le journal *Food Chemistry Advances* [390].

Le séchage est une des méthodes les plus couramment utilisées pour stabiliser la matière végétale mais peut conduire à la dégradation de certains composés thermolabiles. L'impact de la température lors du séchage a donc été évalué sur les lipides et polyphénols des co-produits et sera présenté dans une seconde partie.

Pour proposer un procédé de séchage plus adapté à la chaîne de transformation des grenades occitanes et plus rapide, l'effet de la température de séchage a aussi été évalué avec un sécheur industriel à tapis, par comparaison avec une étuve pilote. La gamme de température de fonctionnement de ce type de sécheur a nécessité la sélection des co-produits peu sensibles à la chaleur, tels que définis dans la partie précédente. Ces travaux sont présentés dans une troisième partie.



## 5.1. Effet de l'ensilage des co-produits de grenade sur leur composition chimique

### Changes occurring in spontaneous fermentation of pomegranate transformation byproducts: case of pericarp phenolics and seed pomace lipids

Lamotte Alexandra<sup>a</sup>, Cerny Muriel<sup>a</sup>, Raynaud Christine<sup>ab</sup>, Alignan Marion<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Chimie Agro-industrielle, LCA, Université de Toulouse, INRAE, Toulouse, France

<sup>b</sup>Centre d'Application et de Traitement des AgroRessources (CATAR), INP, Toulouse, France

\* Corresponding author; Postal Adress: Laboratoire de Chimie Agro-industrielle, 4 allée Emile Monso, BP 44 362, 31 030 Toulouse Cedex 4; Tel: +335 34 32 35 26.

*E-mail addresses:* alexandra.lamotte@toulouse-inp.fr (Lamotte A.), muriel.cerny@toulouse-inp.fr (Cerny M.), marion.alignan@toulouse-inp.fr (Alignan M.), christine.raynaud@toulouse-inp.fr (Raynaud C.).

#### Abstract

Pomegranate byproducts are considered as a source of natural bioactive compounds: phenolics from pericarp and lipids from seed pomace. The aim of this study is to establish the variations of individual phenolics in pomegranate pericarps and lipids in seed pomace, respectively, separately subjected to spontaneous fermentation. After a weekly follow-up of 8 weeks, the total phenolic content of the pericarp extract diminished over spontaneous fermentation from 216 to 155 mg gae/g dw. Ellagitannins were found to be the main phenolics, and a decrease in punicalagin (from 115.4 to 12.6 mg/g dw) was associated with increases in punicalin and ellagic acid (from 2.3 to 77.4 and from 2.9 to 24.8 mg/g dw, respectively). In seed pomace, spontaneous fermentation increases oil yield from 10 to 19 %, while a maximal rather small diminution of 4.3 % of total fatty acids was found for the predominant fatty acid, punicic acid. Spontaneous fermentation thus seems to affect pomegranate byproducts phytochemicals in a mixed manner and both the increase of ellagic acid and oil yield would allow its use as pre-treatment for pomegranate byproduct valorisation.

#### Keywords

Pomegranate - Byproducts - Spontaneous fermentation - Phenolics - Oil - Fatty acids

### 5.1.1. Introduction

Pomegranate byproducts are generated from the processing of the fruit into ready-to-eat pomegranate seeds, juice, jelly or marmalade. Pomegranate transformation processes involve either rind separation and optionally fleshy seed squeezing or whole fruit pressing in one single step. Pomegranate byproducts, rind and seed pomace, account for half of the fruit weight [391], with volumes closely related to pomegranate cultivation worldwide. Pomegranate cultivation has increased sharply in the last decade from 2.5 to 5.8 million tons produced in the main producing countries between

2012 and 2019 [392]. This increase likely led to a similar change in byproduct volumes and consequently a need to manage them in accordance with global environmental guidelines and local regulations.

The pomegranate rind, or pericarp, is composed of a thin skin (exocarp) and a spongy part (mesocarp) [142], whereas the seed press residue, or seed pomace [393], is composed of the remains of pulpy testa and the inner part of the seed [46]. Pomegranate pericarp and seed pomace contain valuable phytochemicals, namely, phenolics and fatty acids, respectively. Pericarp phenolics have been described as mainly hydrolysable tannins belonging to the ellagitannin family, such as punicalagin, pedunculagin, punicalin and other glycosyl-bound ellagic acid derivatives [307]. Pomegranate fatty acids are found as triglycerides in oil extracted from the inner part of the seed. Their principal representatives are conjugated linolenic acids such as punicic acid [394]. Pomegranate pericarp and seed pomace phytochemicals (i.e., phenolics and conjugated linolenic acids) exhibit various properties, such as antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, and anticancer properties, and can prevent diabetes or obesity, but the underlying mechanisms are still under investigation [395]. These properties have led to the investigation of applications in the food field, such as preservation of meat, fruit and transformed products as reviewed by Kaderides et al. [99]. Pomegranate oil might be consumed as is in daily meals, nevertheless recent trends have shown its potential as additive in food products and especially meat and fish products as reported by Paul & Radhakrishnan [396].

In view of the evolution of byproduct volumes, their composition in terms of value-added compounds and the current challenges of sustainability, pomegranate byproduct valorisation has become a significant issue in the pomegranate processing industry. As a result, extensive research is ongoing on eco-friendly methods for recovering value-added compounds [397] and potential applications in the pharmaceutical, nutraceutical, cosmetic, and agri-food sectors [398] as well as on the direct use of byproducts in animal feed [387,399]. Some outcomes have pointed out the relevance of pomegranate byproduct silage for livestock feed [226,400]. According to FAO [245], silage aims to extend animal feed's shelf life and nutritional quality by storing it compacted in an airtight container (silo) which triggers anaerobic spontaneous fermentation. This purpose resulted in research mainly focused on the impact of fermenting pomegranate byproducts on their nutritional value for livestock feed, regardless of individual phenolics or lipids.

Despite its relevance for animal feed, spontaneous fermentation have also shown to induce an evolution of the phytochemical content of other byproducts from the fruit and vegetable industry [393]. This change is likely caused by the selective growth of anaerobes naturally present within the matter: mainly lactic acid bacteria, yeasts, and to a lesser extent molds, enterobacteriaceae, aerobic spore-forming bacteria, *Clostridium*, *Listeria*, acetic acid bacteria, and propionic acid bacteria [401]. Although this microbial ecosystem is rather complex, a recent investigation on naturally fermented carrot juice revealed a certain consistency regardless of the vegetable origin [251].

The microorganism growth during fermentation leads to substrate modifications such as the consumption of simple sugars, the cell wall degradation and the production of organic acids [401]. Part of the changes, however, is related to the initial composition

and potential of hydrogen of the substrate, as well as to the temperature and duration of the fermentation [393]. Together, these phenomena drove shifts in volatile compounds, terpenoids, fatty acids, and phenolics of artichoke [247], apple, grape, and olive [393] byproducts, and there is a lack of knowledge about the effect of spontaneous fermentation on pomegranate byproducts' phenolic and lipid contents.

This study aims to fill this gap by assessing the evolution of the extractables and phytochemical content of pomegranate byproducts after spontaneous fermentation and to enlarge the byproduct's valorisation pathway by adding this technique to the process. Based on the previous research, we hypothesize that pomegranate byproduct fermentation might trigger an evolution in phenolic and lipid contents. The variation of these valuable compounds may enhance antimicrobial or antioxidant capacity of either the extract or oil which might be valuable for an application in the food sector. In addition, most anaerobic fermentation studies compare the material before and after 60 days based on the silage process. However, during fermentation it has been reported that the microorganism population evolves more rapidly within the material [247]. The experimental procedure thus included kinetics allowing evidence of a potential variation in fermented byproduct compounds week by week. Valuable compounds (i.e., phenolics and fatty acids) were quantified in pericarp and seed pomace every week during fermentation up to 8 weeks (60 days).

## **5.1.2. Material and methods**

### **5.1.2.a. Chemicals and reagents**

Folin-Ciocalteu reagent, formic acid, gallic acid, ellagic acid, Supelco 37 Component FAME mix, trimethyl sulfonium hydroxide (TMSH), sodium sulfate, and tert-butyl methyl ether (TBME) were purchased from Sigma–Aldrich (St Quentin Fallavier, France); HPLC-grade methanol from Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France); analytical-grade cyclohexane and sodium carbonate from VWR International (Fontenay sous bois, France); punicalin from Biosynth SRO (Bratislava, Slovakia); and punicalagin from Carbosynth Limited (Berkshire, United Kingdom). Highly purified water was obtained using a Veolia Purelab Classic (Toulouse, France).

### **5.1.2.b. Plant material**

Sixty kilograms of pomegranate byproducts were given by the local company SiBio! (St-Félicien-d'Avall, France) in 2019 and resulted from juice extraction of a blend of 4 pomegranate cultivars (Wonderful, Mollar de Elche, Provence and Acco) grown in Occitanie, France. In the facility, pomegranate pericarps were automatically separated from seeds before pressing, and two lots of byproducts were obtained: pericarps and seed pomace. Unfermented samples (0 week of fermentation) of each byproduct (1 kg) were frozen in liquid nitrogen as received and stored at -20 °C until freeze-drying, then were ground in order to pass successively through 6, 2 and 1 mm grids.

### **5.1.2.c. Spontaneous fermentation**

Byproducts (pericarp or seed pomace) samples of 1 kg were placed into polyethylene bags and pressed to remove the air before being sealed using five layers of polyvinyl chloride film. The sealed bags were then stored at  $17.1 \pm 1.2$  °C (minimum 15.0 °C,

maximum 19.5 °C) in the dark to achieve spontaneous fermentation. After 1 to 8 weeks, the fermented samples (1-8 weeks fermentation) were removed from the bags, frozen in liquid nitrogen and stored at -20 °C until freeze-drying, then were crushed as described for unfermented samples.

#### 5.1.2.d. Phenolic extraction

The extraction of phenolics was adapted from Wang [305]. Phenolics were extracted from pomegranate dry pericarp samples with methanol (1:30 (wt:vol) solid-to-liquid ratio) for 1 h at 20 °C with 1000 rpm stirring. Then, the extracts were filtered through a 0.45 µm polytetrafluoroethylene (PTFE) filter (Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) and stored in the dark at -20 °C until analysis.

#### 5.1.2.e. Methanolic extract yield

The methanolic extract yield was estimated by the gravimetric method. For this purpose, aliquots of 1 mL of pericarp extracts were dried until constant weight at 105 °C. The extraction yield was assessed as the ratio between the weight of the extract and the weight of the pericarp, both on a dry basis, and expressed as gram of extract by gram of unfermented or fermented pericarp (g/g dw).

#### 5.1.2.f. Total phenolic content

The total phenolic content was assessed in pomegranate pericarp extract using the Folin-Ciocalteu technique adapted from Singleton & Rossi [289]. Pericarp methanolic extracts were diluted to 1/100-1/200, and standard gallic acid was prepared to concentrations between 6 and 125 mg/L. Twenty microliters of sample was placed into a 96-well microplate, and then 10 µL of Folin-Ciocalteu reagent and 170 µL of sodium carbonate (2.36 % g/v) were added. Colorimetric analysis was performed with absorbance measurement at 760 nm after 45 minutes of incubation at 45 °C in a BMG-Labtech Spectrostar-Nano spectrophotometer (Champigny sur Marne, France). The results are given as mg gallic acid equivalent per g pericarp, dry weight basis (mg gae/g dw).

#### 5.1.2.g. HPLC-DAD analysis of phenolic compounds

To quantify phenolics, methanolic extracts as well as ellagic acid, punicalin and punicalagin standards were diluted in 80 % methanol in water. High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis was adapted from Canas et al. [402] and carried out with an HPLC System Dionex Ultimate3000 with DAD-3000 detection (200-600 nm) on a Phenomenex Kinetex Biphenyl 150x2.1x2.6, 100A column at 40 °C. The injection volume was set at 10 µL, with a flow rate of 0.3 mL/min. A gradient with water with 0.1 % formic acid (A) and methanol with 0.1 % formic acid (B) was set as follows: 0-6.5 min 2 % B, 11-21 min 10 % B, 25-35 min 30 % B, 37-42 min 40 % B, 47-52 min 98 % B, and 56-60 min 2 % B. Standard calibration curves were made with punicalagins  $\alpha+\beta$  0.8-109 mg/L, punicalins  $\alpha+\beta$  0.8-100 mg/L and ellagic acid 0.4-30 mg/L at 254 nm ( $R^2 > 0.995$ ). The data treatment software was Chromeleon version 6.8. The results are given as mg per g pericarps, dry weight basis (mg/g dw).

#### 5.1.2.h. Oil extraction

The oil extraction was adapted from Ferraz et al. [151]. Oil was extracted from seed pomace using cyclohexane with a solid-to-liquid ratio of 1:15 (wt:vol) at room temperature and vortex stirring for 5 s before centrifuging the mixture. Three sequential extractions were conducted for optimal recovery. Then, the 3 supernatants were collected and pulled, filtered through glass microfiber filters GF/D (Whatman, UK) and sodium sulfate, and evaporated under vacuum with a Büchi Multivapor (Villebon sur Yvette, France).

#### 5.1.2.i. Oil yield

The oil yield of seed pomace was determined by the gravimetric method. The extracted oil was dried until constant weight at 105 °C, and oil yield calculated as the ratio between the mass of oil and the mass of seed pomace, both on dry weight basis. The results are expressed as gram of oil per gram of unfermented or fermented seed pomace (g/g dw).

#### 5.1.2.j. Assessment of fatty acid profile by GC-FID analysis

The fatty acid profile of the seed pomace was assessed with gas chromatography of fatty acid methyl esters (FAMES). FAMES were prepared according to ISO 2016 [403] as follows: milled pomegranate seed pomace (0.6 g) was mixed with TBME (5 mL) and filtrated (PTFE filter, 0.45 µm), and then TMSH (0.2 mL/L in methanol, 30 µL) was added to the filtrate (170 µL). Gas chromatography (GC) analysis was adapted from Agilent Technologies, Inc. [404] and performed on a Varian 3900 FAME GC system with a CP Select CB column (50 m x 0.25 mm x 0.25 µm) equipped with a flame ionization detector (FID) (temperature 360 °C). One microliter of sample was injected in split mode 1/100, with an injector temperature of 250 °C. Helium (1.2 mL/min) was used as carrier gas, with an oven temperature of 185 °C for 40 min, then an increase up to 250 °C at 15 °C/min, and a hold at 250 °C for 11 min. Fatty acid were identified with a commercial mix of 37 fatty acids and commercial pomegranate, tung and Catalpa bignonioides oils.

#### 5.1.2.k. Statistical analysis

The statistical significance of fermentation duration was assessed with an analysis of variance (ANOVA) for the byproduct samples (either pericarp or seed pomace) and a pairwise comparison of fermentation durations performed with a post hoc Tukey HSD test (9 groups for durations from 0 to 8 weeks). A total of 25 ANOVAs were run, and thus, p values were adjusted with Bonferroni's method. Homoscedasticity and normality were assessed by plotting a linear model of ANOVA for each variable. Linear correlations between byproduct compounds were evaluated using the Pearson correlation coefficient. The alpha significance level was set at 0.05 for all statistical tests, and all analyses were conducted with RStudio: Integrated Development for R v2022.07.1.554 (RStudio Team, PBC, Boston, United States of America, <http://www.rstudio.com/>) and R: A Language and Environment for Statistical Computing 4.2.1 2022-06-23 (R Core Team, Vienna, Austria, <https://www.r-project.org/>).

### 5.1.3. Results and discussion

#### 5.1.3.a. Pomegranate pericarp fermentation

##### 5.1.3.a.i. Pericarp composition before and after spontaneous fermentation

Extracts from pomegranate pericarps fermented for 0 to 8 weeks afforded yields between  $0.50 \pm 0.00$  and  $0.28 \pm 0.01$  g/g dw, as presented in figure 5.1-A and Supplementary Table 5.3. The highest methanolic extract yield was obtained from 0-week fermentation ( $0.50 \pm 0.00$  g/g dw), and after 2 weeks, it decreased by 20 % to attain  $0.32 \pm 0.01$  g/g dw and then diminished slightly until 7 and 8 weeks, with minimal values of  $0.31 \pm 0.01$  and  $0.28 \pm 0.01$  g/g dw, respectively. Pericarp extract yields were of similar magnitude as those found in the literature. El-Hadary & Ramadan [166] and Ranjha et al. [304] obtained between 0.28 and 0.35 g/g dw extract using maceration of pomegranate pericarp with methanol and water mixtures of 50:50, 75:25 and 80:20. Wang [305] and Rongai et al. [127] extracted pomegranate pericarp with pure methanol and reported yields between 17.4 and 46 %. The huge range of extract yields might be explained by dissimilar extraction conditions, such as employment of ultrasound power [127] and different solid-to-liquid ratios (1/15 [304,305], 3/25 [127] and 1/5 [166]), temperatures (room temperature [166] or 40 °C [127,304,305]), and extraction time (from 4 h to 24 h).

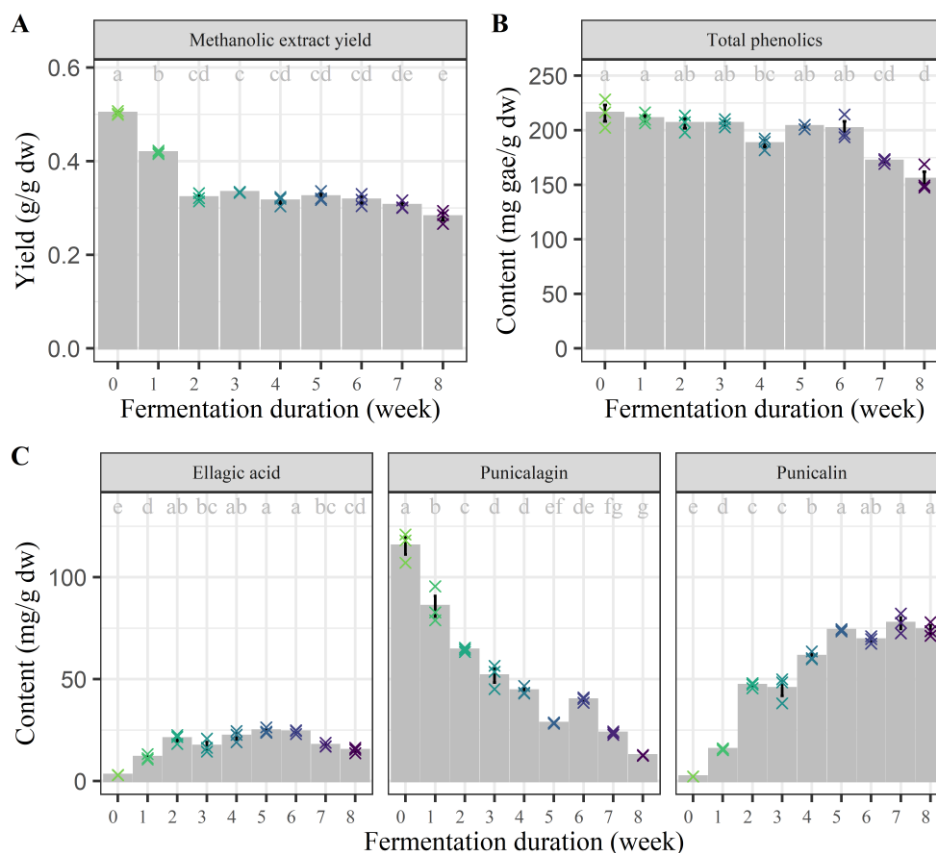


Figure 5.1: Pericarp extract yields and phenolic contents from 0 to 8 weeks of spontaneous fermentation. Solid bars represent average component values and each replicate is depicted with a cross (mean of at least 3 assay replications). Different letters in the same component frame means significant differences at 0.05 significance level by posthoc Tukey test.

The total phenolic content of pomegranate pericarp fermented from 0 to 8 weeks is presented in figure 5.1-B. The initial total phenolic content ( $215.62 \pm 13.00$  mg gae/g dw) decreased up to  $155.19 \pm 11.77$  mg gae/g dw after 8 weeks. During the first 6 weeks of fermentation, no significant change in the total phenolic content was observed, except for a slightly lower value at the 4th week. A significant diminution appeared from 7 to 8 weeks fermentation with a drop from  $201.53 \pm 11.28$  the 6th week down to  $171.74 \pm 2.28$  and  $155.19 \pm 11.77$  mg gae/g dw the two last weeks. Total phenolic contents were in accordance with available literature data expressed as the dried matter basis of pericarps. The total phenolic content of pomegranate pericarp extracted using mixtures of methanol and water ranged from 46 [304] to 188.9 mg gae/g dw [166] depending on the extraction conditions. The extraction method greatly influenced the total phenolic content, as stated by several studies focusing on solvent efficiency or ultrasound relevance to extract pericarp phenolics. Ultrasound-assisted extraction or maceration using methanol, ethanol and acetone at 50 or 75 % in water resulted in total phenolic contents ranging from 33.71 to 72.21 mg gae/g in pomegranate pericarp from Pakistan [304]. A comparison of ether, ethyl acetate, ethanol, methanol and water extraction using a Soxhlet apparatus revealed total phenolic contents between 65.0 and 188.9 mg gae/g, and methanol was the most potent solvent [166]. Total phenolic content variations might also be attributed to pomegranate cultivar since Rongai et al. [127] reported total phenolic contents ranging from 146.0 to 612.7 mg gae/g on a dry matter basis of hydroalcoholic extracts of 20 pomegranate genotypes.

Authentic standards of individual phenolics were chosen for quantitative HPLC analysis according to their structure and abundance in pomegranate pericarps recorded in the literature. Punicalagin, as the major ellagitannin from pomegranate pericarps [59], was thus selected, as well as other ellagitannin derivatives, punicalin and ellagic acid. In the present study, punicalagin was also found to be the main ellagitannin within pericarp before fermentation compared to ellagic acid and punicalin contents (figure 5.1 C). For all the fermentation duration, punicalagin, punicalin and ellagic acid contents ranged from  $115.35 \pm 7.30$  to  $12.58 \pm 0.21$ , from  $2.25 \pm 0.03$  to  $77.44 \pm 4.85$  and from  $2.94 \pm 0.08$  to  $24.79 \pm 1.41$  mg/g dw, respectively. The maximum punicalagin content of  $115.35 \pm 7.30$  mg/g dw was reached in the pericarp before fermentation (0 weeks), while the lowest value was obtained after 8 weeks of fermentation, with no significant difference between the 8 and 7-week samples ( $12.58 \pm 0.21$  and  $23.60 \pm 0.82$  mg/g dw, respectively). In contrast, both punicalin and ellagic acid levels were minimal in unfermented pomegranate pericarp ( $2.25 \pm 0.03$  and  $2.94 \pm 0.08$  mg/g dw, respectively). The highest punicalin values were obtained after the 5th week of fermentation from  $69.38 \pm 1.84$  to  $77.44 \pm 4.85$  mg/g dw, although no significant difference appeared between the 4th and 6th weeks. Ellagic acid levels were significantly higher at the 5th and 6th weeks ( $24.79 \pm 1.41$  and  $24.19 \pm 1.00$  mg/g dw, respectively) than unfermented pericarps and after 1, 3, 7 and 8 weeks of fermentation.

Both the punicalagin and ellagic acid contents were in agreement with reported values of 98.0 and 12.5 mg/g dw, respectively, using close extraction parameters (pericarp maceration with 80 % methanol in water) [166]. The extraction solvent effect on ellagitannins has been investigated recently [171] on the Mollar de Elche and Purple Queen cultivars and influenced greatly the recorded levels of punicalagins, ellagic acid

and other hydrolysable tannins, with values ranging from 27 to 134 mg/g dw for the first and from 0.7 to 6.2 mg/g dw for the second. Similar changes were also highlighted when both 18 pomegranate cultivars and pericarp parts (either exocarp or mesocarp) were compared [142], with punicalagin levels of 9.8-39.7 and 10.9-30.0 mg/g dw and ellagic acid levels of 4-9 and 0.6-5.2 mg/g dw in exocarp and mesocarp, respectively.

### 5.1.3.a.ii. Relationship between fermentation and pericarp phytochemicals

A principal component analysis (PCA) biplot (figure 5.2) was constructed with the fermentation duration and the composition (variables) of pericarp samples (individuals) on the first principal component (PC1) and second principal component (PC2). PC1 and PC2 explained 78.5 and 17.4 % of the total variance between the samples, respectively, for an overall explained variance of 95.9 %. PC1 is represented efficiently by all the variables studied since all loadings are interpretable (table 5.1).

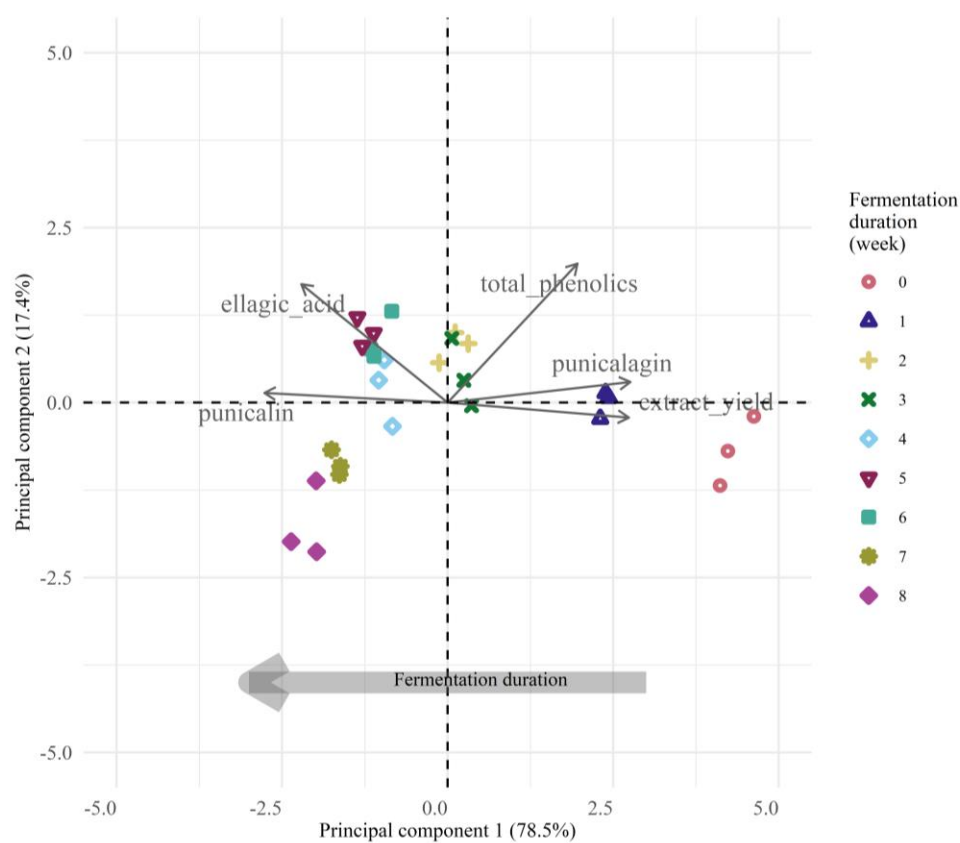


Figure 5.2: *Principal component analysis biplot of pericarp sample scores and loadings (yield and phytochemical contents) on the first and second principal component (PC1 and PC2) plane. Fermentation duration: 0 week - open circle, 1 week - upward-pointing triangle, 2 weeks - plus, 3 weeks - cross, 4 weeks - diamond, 5 weeks - downward-pointing triangle, 6 weeks - square, 7 weeks - solid circle, 8 weeks - solid diamond.*



Table 5.1: Variable (pomegranate pericarp yield and phytochemical contents) loadings on the first and second principal component (PC1 and PC2) plane.

Variable	Principal component (PC)			
	PC1 (78.53%)	p (PC1)	PC2 (17.39%)	p (PC2)
extract_yield	<b>0.97</b>	<b>&lt;0.001</b>	-0.08	0.708
ellagic_acid	<b>-0.78</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.60</b>	<b>0.001</b>
punicalagin	<b>0.97</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.10	0.605
punicalin	<b>-0.98</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.05	0.808
total_phenolics	<b>0.69</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.70</b>	<b>&lt;0.001</b>
fermentation_duration		<b>&lt;0.001</b>		<b>&lt;0.001</b>

Statistical correlations of variables on PC1 or PC2 are given by ACP loadings and p values in bold (significance level  $p < 0.05$ ). Fermentation duration descriptions on PC1 and PC2 are given by ACP p values ( $< 0.05$ ) and correlations in bold.

Extract yield and punicalagin and total phenolic contents were positively correlated with PC1, whereas ellagic acid and punicalin contents were negatively correlated with PC1. Total phenolic and ellagic acid contents mostly explained the differences between pericarp samples on PC2. Pomegranate pericarp samples were plotted from right to left according to fermentation duration, from 0 to 8 weeks, with minor variations among sample replicates. The differences between pericarp samples might be explained by extract yield, total phenolics and individual phenolic contents. The composition was thus linked directly to fermentation, and fermentation affected the extract yield, total phenolics and individual phenolics of pomegranate pericarps. Punicalagin, total phenolic content and extract yield were correlated with each other, whereas ellagic acid and punicalin contents tended to go in opposite directions. In other words, a high punicalagin content meant a high total phenolic content and extract yield but low ellagic acid and punicalin contents. However, punicalagin seemed to represent the main phenolic since the total phenolic content and extract yield tended in the same direction.

The samples fermented for less than 2 weeks showed the highest total phenolic and punicalagin contents and extract yield and the lowest ellagic acid and punicalin contents. As fermentation duration increased, the trend changed dramatically, and the highest ellagic acid and punicalin contents were found for the 8-week fermented pericarp, with the lowest punicalagin and phenolic contents and extract yield. Pericarps fermented for 2 or 3 weeks demonstrated medium content of all analyzed compounds. Fermentation time from 0 to 1 week was related to high extract yield, punicalagin and total phenolic contents, while duration from 4 to 8 weeks involved high ellagic acid and punicalin contents.

A correlation matrix was computed (Supplementary figure 5.5) to assess the intensity and significance of the relationships between the phenolics from fermented pomegranate pericarps. Punicalagin and total phenolic contents, as well as punicalin and ellagic acid contents, were highly positively correlated ( $R^2 > 0.7$ ,  $p < 0.05$ ), whereas punicalin and either punicalagin or total phenolics were negatively correlated ( $R^2 < -0.7$ ,  $p < 0.05$ ). The ellagic acid and total phenolic contents were not significantly correlated ( $p > 0.05$ ). The strongest relationship occurred between punicalagin and punicalin contents, which was consistent with the PCA's computation,

meaning that along with a decrease in punicalagin content and an increase in punicalin content, a similar trend was observed between punicalagin and ellagic acid contents.

These results suggest that fermenting of pomegranate pericarps might trigger the transformation of punicalagin into ellagic acid and punicalin, with an overall diminution of total phenolics and extract yield. Indeed, after 8 weeks of fermentation, the punicalagin content decreased by 89 % from  $115.35 \pm 7.30$  to  $12.58 \pm 0.21$  mg/g dw, the total phenolic content decreased by 28 % from  $215.62 \pm 13.00$  to  $155.19 \pm 11.77$  mg gae/g dw, and the extract yield decreased by 22 % from 50 to 28 % g/g dw. Conversely, punicalin and ellagic acid contents increased by 30- and 4-fold from  $2.25 \pm 0.03$  to  $74.24 \pm 3.42$  and from  $2.94 \pm 0.08$  to  $15.14 \pm 1.36$  mg/g dw, respectively.

To our knowledge, only one original paper evaluated the phenolic content of pomegranate pericarp before and after ensilage [226] which is directly related to spontaneous fermentation. Shabtay et al. [226] reported that 50-day ensiling of pericarps had no significant effect on total phenolics compared to fresh matter (140-155 mg gae/g dw), whereas punicalagin content decreased from 42 to 22 mg/g dw. Silage containers were stored at 22-25 °C for 50 days, whereas in the present study, the average temperature was 17.1 °C, which might lead to different reactions and microorganism growth rates. Indeed, Fan et al. [247] demonstrated changes in the microbial community over silage fermentation of artichoke byproducts, and these changes were correlated with variations in polyphenol and terpenoid contents. Spontaneous fermentation of pomegranate pericarp might thus involve a population of microorganisms that might evolve differently among the process conditions and durations. The dissimilar changes in total phenolic content could therefore reflect unequal fermentation kinetics between the two surveys, since in the current report this content was similar between unfermented and fermented pericarps from 1 to 3 weeks and from 5 to 6 weeks, whereas in the reported report [226] this content was not followed over time.

Despite the low availability of studies on spontaneous fermentation or silage, pomegranate pericarp inoculated fermentation has been studied to a larger extent. These studies aimed to produce ellagic acid from pomegranate hydrolysable tannin hydrolysis, and consequently, most of them excluded other phenolic quantifications [405,406]. Nevertheless, Moccia et al. [407] recently evaluated the effect of fermentation using *Aspergillus niger* or *Saccharomices cerevisiae* on phenolic extraction from pomegranate pericarps. The ellagic acid content was increased by 2- and 5-fold after fermentation, with an initial value of 4.8 mg/g to final contents of 9.0 and 46 mg/g for fungal and yeast fermentations, respectively, on a dry extract basis. The punicalin content also increased with fermentation, with unfermented matter containing 125 mg/g and fungal or yeast fermented matter at approximately 200 mg/g. Punicalagin content diminished from 650 mg/g to 110 and 25 mg/g after *A. niger* and *S. cerevisiae* fermentation, respectively. These results are in accordance with the present study, as both ellagic acid and punicalin contents were enhanced by spontaneous fermentation, whereas punicalagin levels decreased. The maximum increase in ellagic acid content was obtained between 5 and 6 weeks, with an 8-fold higher value compared to the initial pericarps; thus, spontaneous fermentation over 5-6 weeks might be an alternative to inoculated fermentation.

Further research on microbial community evolution during pericarp uninoculated fermentation might also provide useful knowledge of microorganism strains that are more efficient for pomegranate ellagitannin transformation to ellagic acid.

Pomegranate pericarp spontaneous fermentation for up to 8 weeks thus had a deleterious effect on the main ellagitannin punicalagin, as its content diminished by nearly 90 % after 8 weeks. Despite the fact that punicalagin seems to represent most of the phenolics from pericarps, the total phenolic content decreased to a lesser extent, with a diminution of 30 %. The loss of punicalagin might be explained by its hydrolysis since both punicalin and ellagic acid contents were increased compared to raw matter. Punicalagin transformation into ellagic acid and punicalin involves the cleavage of ester bonds of the hexahydroxydiphenoyl- (HHDP) moiety, ending in punicalin and hexahydroxydiphenic acid, which is transformed to ellagic acid through lactonization. The rupture of the ester linkage might result from either microorganism hydrolytic enzymes such as carboxylic ester hydrolases or medium acidification. However, the total loss of punicalagin (103 mg/g dw) was higher than the gain of punicalin (72 mg/g dw) and ellagic acid (12 mg/g dw) after 8 weeks of fermentation, and ellagic acid content reached its maximum increase at 5-6 weeks (22 mg/g dw) and then diminished. Spontaneous anaerobic fermentation might thus involve both punicalagin hydrolysis into lower molecular weight compounds and further degradation or transformation of the remaining compounds. Indeed, the phenolic structure entails a strong antioxidant capacity, and consequently, oxidative stress induced by fermentation might significantly affect their contents. The comprehension of the mechanisms behind phenolic evolution over spontaneous fermentation of pomegranate pericarp still needs to be investigated.

### **5.1.3.b. Seed pomace fermentation**

#### **5.1.3.b.i. Characterization of raw and fermented pomace**

Spontaneous fermentation of seed pomace had a significant effect ( $p < 0.05$ ) on oil yield, with values ranging from  $0.10 \pm 0.00$  to  $0.19 \pm 0.04$  g/g dw (Supplementary Table 5.4). Oil yields were significantly higher after 6, 7 and 8 weeks of fermentation,  $0.18 \pm 0.02$ ,  $0.19 \pm 0.01$  and  $0.19 \pm 0.04$  g/g dw, respectively, compared to the unfermented residue (figure 5.3-A). However, from 1 to 5 weeks of fermentation, oil yield was not significantly different from unfermented seed pomace and was between  $0.13 \pm 0.00$  and  $0.14 \pm 0.00$  g/g dw. The oil yield was in line with literature data, where a value of 11.8 % was reported in pomegranate pomace [408]. Other recorded yields are often slightly higher than those presented herein since oil was extracted from the inner part of pomegranate seed only, i.e., the seed pomace was washed to remove the leftovers of the testa after juicing. In this context, oil reached values from 17.26 to 22.73 % (g/g dw) depending on the extraction conditions (supercritical fluid extraction with carbon dioxide, maceration or Soxhlet with n-hexane) [88,394]. Oil yield variations between the present study and reported values might also be attributed to the extraction solvent (cyclohexane and n-hexane), but cyclohexane was preferred considering its lower toxicity.

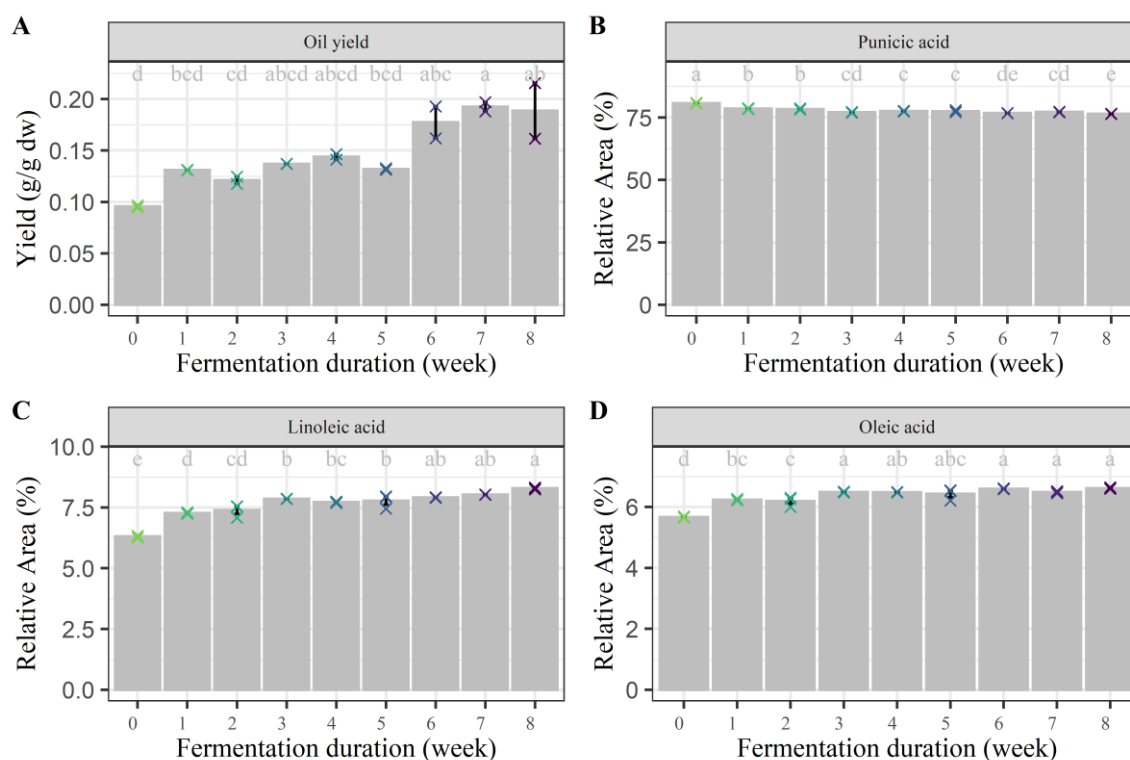


Figure 5.3: Seed press residue oil yield and major fatty acid relative contents over 8 weeks of spontaneous fermentation. Solid bars represent average component values and each replicate is depicted with a cross (mean of at least 3 assay replications). Different letters in the same component frame means significant differences at 0.05 significance level by posthoc Tukey test.

The fatty acid profile of fermented seed pomace is given in Supplementary Table 5.4. Spontaneous fermentation had significant effects ( $p < 0.05$ ) on 11 out of 14 identified fatty acid relative contents. Punicic acid (C18:3n-5 c,t,c) was the predominant fatty acid, accounting for more than 75 % of the total fatty acids in each fermentation time, with values ranging from  $80.71 \pm 0.20$  to  $76.46 \pm 0.06$  %. The fatty acids present at levels over 1 % included palmitic (C16:0), stearic (C18:0), oleic (C18:1n-9) and linoleic (C18:2n-6) acids with relative contents between  $2.65 \pm 0.01$  and  $3.62 \pm 0.02$ ,  $1.81 \pm 0.01$  and  $2.02 \pm 0.01$ ,  $5.66 \pm 0.03$  and  $6.61 \pm 0.03$ ,  $6.31 \pm 0.05$  and  $8.29 \pm 0.04$  %, respectively. The remaining fatty acids (myristic, palmitoleic,  $\alpha$ -linolenic, catalpic,  $\beta$ -eleostearic, arachidic, eicosenoic, behenic and lignoceric acids) were found at relative contents below 1 %. Among them, the relative contents of palmitoleic, catalpic and behenic acids alone were not significantly affected by fermentation, with average contents of nearly 0.00 (0.003), 0.85 and 0.19 %, respectively.

The evolution of the relative contents of the main fatty acids over spontaneous fermentation is presented in figure 5.3-B-D. The punicic acid content decreased slightly by 4.25 % after 8 weeks of fermentation, whereas the linoleic and oleic acid contents barely increased by 1.98 and 0.95 %, respectively. Fatty acids with contents below 5 % were not represented, as variations over fermentation were also quite minimal and represented less than 1 %.

The fatty acid profiles were in agreement with those obtained by Tan et al. [394] from the inner part of pomegranate seed, with 87.59 % punicic acid and its isomers, 4.10 % linoleic acid, 3.81 % oleic acid and 1.71 % stearic acid. Durdevic et al. [88] reported

a similar overall trend but a lower content of punicic acid (53-60 %) in favor of its isomers (19.38-26.96 %). This difference might be due to punicic acid isomerization occurring during the preparation of fatty acid methyl esters (FAMEs) [92], as methylation was performed at either room temperature [394] or 90 °C [88].

#### 5.1.3.b.ii. Linkage of fermentation and seed pomace components

Principal component analysis (PCA) was computed with the oil yield and fatty acid profile of pomegranate seed pomace samples obtained before and during 8 weeks of spontaneous fermentation (figure 5.4). This analysis was chosen to explain the fermentation effect on the byproduct components with consideration for fatty acids and oil yield. Palmitoleic, catalpic and behenic acids were therefore removed from the dataset since they were not affected by fermentation. The PCA first and second components (PC1 and PC2) represented 86.46 % of the variance between samples, with 74.90 % and 11.56 % explained variance, respectively.

The interpretable variables (residue components) are given by their loadings and associated p values in Table 5.2, as well as the significance of fermentation duration along PC1 and PC2. The components that were the largest contributors (absolute loading > 0.9) to the variations between pomace samples were oil yield and 8 saturated (myristic, palmitic, stearic, arachidic acids) and unsaturated (oleic, linoleic,  $\beta$ -eleostearic, punicic acids) fatty acids. Therefore, oil yield and these fatty acids were the most relevant components for the description of the effect of spontaneous fermentation on seed pomace. There were strong positive correlations between most of the components from seed pomace, at the opposite trend of punicic acid content and not linked with  $\beta$ -eleostearic content. Therefore, as the punicic acid content diminishes, the saturated, monosaturated and linolenic acid contents increase, suggesting hydrogenation of the former to the latter. Another relevant aspect is that unfermented samples had the highest punicic relative content and lowest oil yield and myristic, palmitic, stearic, oleic, linoleic and arachidic acid contents. As fermentation duration increased, the content of punicic acid diminished to the benefit of other fatty acid contents and oil yield. The  $\beta$ -eleostearic content followed another trend since it reached its minimum value in the 8-week samples compared to the seed pomace fermented for 0 to 7 weeks. Pomegranate seed pomace fermentation thus decreases its main polyunsaturated fatty acid content (punicic acid) and, to a certain extent, its isomer  $\beta$ -eleostearic content but increases oil yield and the other fatty acid contents. The highest fatty acid content change was found for punicic acid, with a 4.25 % decrease, while the oil yield increased by 9 % g/g dw. These findings indicate that fermenting seed pomace might trigger a reduction in polyunsaturated fatty acid content coupled with a substantial increase in oil yield.

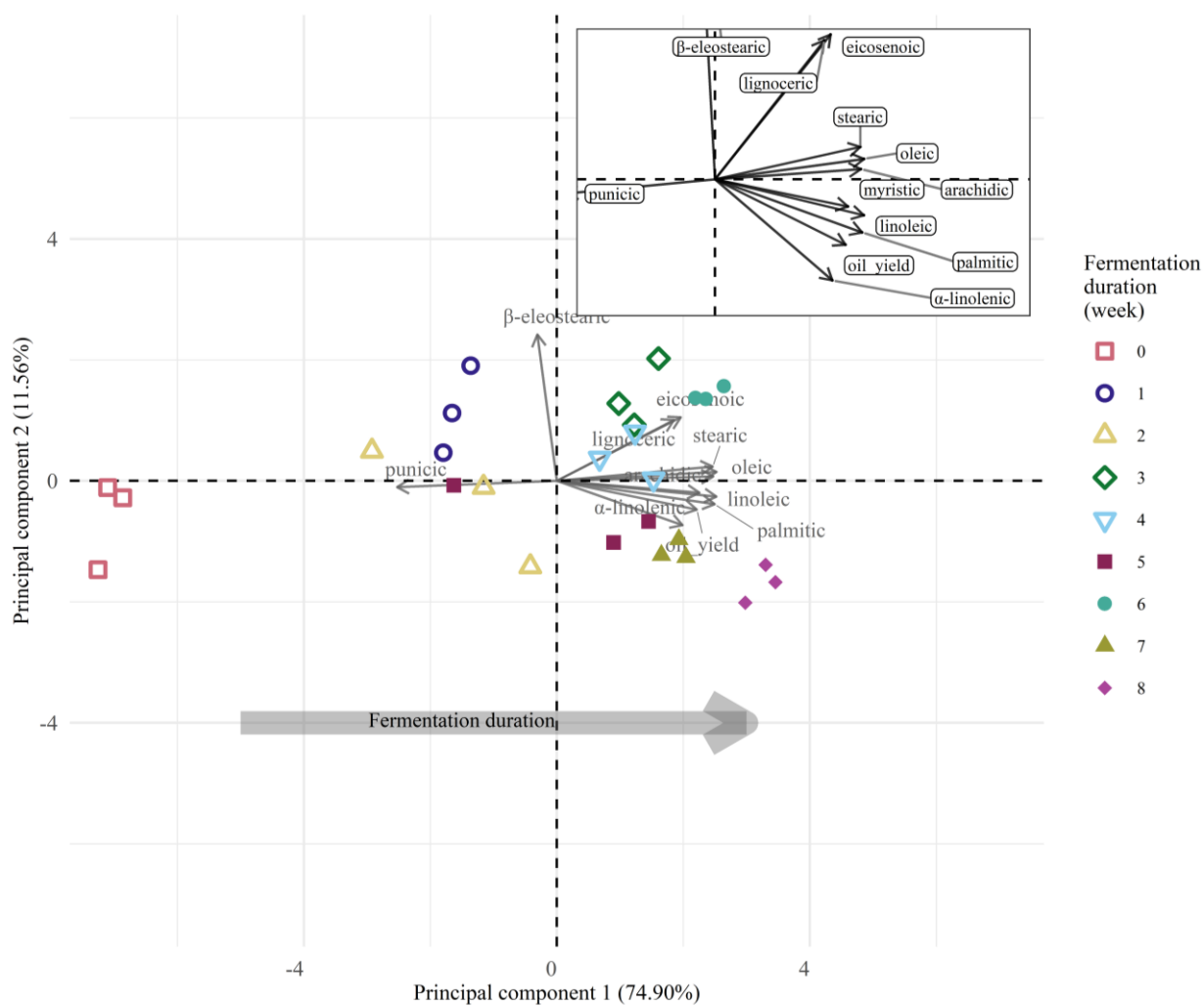


Figure 5.4: *Principal component analysis biplot of press seed residue sample scores and loadings (oil yield and fatty acid relative contents) along the PC1 and PC2 plane. Fermentation duration: 0 week - open circle, 1 week - upward-pointing triangle, 2 weeks - plus, 3 weeks - cross, 4 weeks - diamond, 5 weeks - downward-pointing triangle, 6 weeks - square, 7 weeks - solid circle, 8 weeks - solid diamond.*

Table 5.2: Variable (pomegranate seed press residue oil yield and fatty acid relative contents) loading on the first and second principal components (PC1 and PC2) plane.

Variable	Principal component (PC)			
	PC1 (74.90%)	p (PC1)	PC2 (11.56%)	p (PC2)
oil_yield	<b>0.86</b>	<b>&lt;0.001</b>	-0.19	0.353
myristic	<b>0.88</b>	<b>&lt;0.001</b>	-0.08	0.702
palmitic	<b>0.97</b>	<b>&lt;0.001</b>	-0.15	0.453
stearic	<b>0.96</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.09	0.649
oleic	<b>0.99</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.06	0.775
linoleic	<b>0.99</b>	<b>&lt;0.001</b>	-0.10	0.612
$\alpha$ -linolenic	<b>0.78</b>	<b>&lt;0.001</b>	-0.29	0.147
punicic	<b>-0.99</b>	<b>&lt;0.001</b>	-0.04	0.84
$\beta$ -eleostearic	-0.12	0.551	<b>0.95</b>	<b>&lt;0.001</b>
arachidic	<b>0.97</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.03	0.886
eicosenoic	<b>0.77</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.41</b>	<b>0.034</b>
lignoceric	<b>0.72</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.39</b>	<b>0.042</b>
fermentation_duration		<b>&lt;0.001</b>		<b>&lt;0.001</b>

Statistical correlations of variables on PC1 or PC2 are given by ACP loadings and p values in bold (significance level  $p < 0.05$ ). Fermentation duration descriptions on PC1 and PC2 are given by ACP p values ( $< 0.05$ ) and correlations in bold.

The increase in oil yield after the fermentation of pomegranate seed pomace is supported by the investigation by Kara et al. [235], as an increase from 6.33 to 7.63 % of oil yield was demonstrated after whole pomegranate byproduct ensilage (i.e., byproducts obtained by squeezing the whole fruit). This slight increase compared to our 9 % increase might be attributed to the presence of pomegranate pericarp in the silage, which contains approximately 1 % oil [304] and thus leads to a lower yield. Taher-Maddah et al. [400] and Ülger et al. [409] ensiled pomegranate pulp or seed pomace and described a moderate oil yield decline after ensilage (not significant for the former) with values from 12 to 11 % and 11 to 10 % (g/g dw), respectively. These results are surprising since in both studies, acid detergent fiber (ADF) and neutral detergent fiber (NDF) contents decreased, signaling the degradation of the cell wall [410]. Cell wall degradation should lead to an increase in extracted oil yield, as reported after the incubation of grape seeds with cell wall-degrading enzymes [411]. Indeed, this trend was also demonstrated for sunflower seed with an oil yield improvement of 10 % after their spontaneous fermentation through ensilage (from 28.1 to 37.8 % g/g dw) [412].

The fatty acid profile of spontaneously fermented pericarp and seed (60 days lasting ensilage) was analyzed by Kazemi & Valizadeh [386], and a majority of punicic acid (68.32 % of total fatty acids) was found, followed by linoleic acid (7.58 %) and oleic acid (6.37 %). This is consistent with our fatty acid profile, while we found 10 % more punicic acid after 8 weeks of fermentation ( $76.46 \pm 0.06$  %). This gap is quite understandable since punicic acid relative content is known to differ according to pomegranate origin, cultivar and harvest time. Indeed, Alcaraz-Marmol et al. [193] demonstrated a variation of 14 % (relative content) of punicic acid between 20 pomegranate cultivars. To our knowledge, the fatty acid profile of either the seed pomace or the inner part of the seed has not been compared before and after spontaneous fermentation or ensilage. However, ensiling corn (28 days) greatly affects

the relative and absolute contents of saturated fatty acids and mono- and polyunsaturated fatty acids (% and mg/kg dw) [253]. Han & Zhou [253] described an enhancement of palmitic and stearic acid relative contents (40 % and 7 %, respectively) and a diminution of oleic, linoleic and linolenic acids (1.91 %, 10.87 % and 1.51 %, respectively) relative to the initial content. In the present study and in regard to initial content, the relative contents of palmitic and stearic acids were improved by 36.7 and 11.8 %, respectively, which were quite similar, but oleic and linoleic acids were also increased by 16.7 and 31.3 %, respectively, while the punicic acid content decreased much less (5.3 %). Han & Zhou [253] also demonstrated that the addition of antioxidants to corn silage prevented the decrease in unsaturated fatty acids without affecting saturated fatty acid contents. The slight loss of punicic acid might thus result from the presence of seed testa residue and juice leftovers in pomegranate seed pomace, which contains phenolics with antioxidant activity [395].

#### 5.1.4. Conclusion

Spontaneous fermentation of pomegranate byproducts causes variations in their molecular content due to anaerobic fermentation occurring during the process. On the one hand, fermenting pomegranate pericarp is deleterious for total phenolic content, with decreases of 2-4 % in the first three weeks and up to 30 % in the 8th week. Pericarp handling processes should thus be adequate and quite short if the objective is to extract a high amount of phenolics. Even though the total phenolic content diminished over fermentation time, it still represented 16 % of the pericarp content after 8 weeks. In addition to total phenolics, individual phenolic quantification over spontaneous fermentation demonstrated that the predominant phenolic in pericarps, punicalagin, content decreased constantly up to nearly 90 % after 8 weeks. The diminution of punicalagin was correlated with an important 30-fold increase in punicalin content, which has been linked to punicalagin hydrolysis. Similarly, ellagic acid content was multiplied by 5 to 8 with fermentation, potentially also as a result of punicalagin hydrolysis. Nevertheless, its content diminished slightly after 6 weeks, bringing along some additional considerations about the fate of the phenolics within the matter.

On the other hand, spontaneous fermentation of pomegranate seed pomace increased oil yield by 9 % and scarcely changed the fatty acid profile. Punicic acid was found at 76 % of total fatty acids after 8 weeks, representing nearly 5 % less than unfermented material. According to the huge improvement in oil yield compared to the rather low diminution of punicic acid, an increase in the punicic acid amount extracted from seed pomace might be expected if fermentation is employed as a pretreatment.

The accumulation of ellagic acid would allow the development of a food supplement enriched with this molecule that has already demonstrated its nutritional potential. Pomegranate pericarp fermentation with microorganism inoculation has been widely studied to produce ellagic acid from ellagitannins. The spontaneous fermentation of the pomegranate pericarp might thus be an eco-friendly and low-cost alternative to controlled fermentation for ellagic acid production; however, its duration must be chosen carefully to obtain the highest yield, and a more critical purification step might be needed to integrate food additives or supplements.



The increase of the oil extractability makes spontaneous fermentation interesting as a pre-treatment of the pomegranate seed pomace prior to oil extraction. The pomegranate oil extracted from the fermented residues might be incorporated as it is in meals or in food preparations in view of its punicic acid content, which confers it a nutritional relevance. In addition, its antioxidant and antimicrobial activity should be maintained due to the minor changes in its fatty acid profile, thus making it appropriate for use as an additive in the food industry. Further research might be necessary to assess the feasibility of fermentation followed by mechanical pressing for oil extraction, but these results are promising.

This study has shown that spontaneous fermentation, although generally used in animal feed as ensilage, might also have a place in the manufacturing of products for human consumption. In the food industry, process costs are always a major concern, and the improvement of productivity and yields remains a constant. Added to this is the need to adopt circular economy models. The spontaneous fermentation might be viewed as part of organic matter processing that might improve yields of value-added molecules. Since it requires limited equipment, it would be implementable in most processing plants. Its implementation requires, however, to ensure food safety in the case of fractions intended for human consumption. Therefore, additional investigation into the safety of the final products or the addition of supplementary extraction or purification steps would be required.

#### ACKNOWLEDGMENTS

LA performed the experiments, and CM designed the experiments specific to seed pomace. AM and RC directed the design of experiments and helped for data analysis. LA conducted analysis of data and wrote the manuscript. AM and RC revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### FUNDING

This study was supported by Région Occitanie [grant number DF-000052] and European funding FEDER [grant number MP0014568].

#### DECLARATION OF COMPETING INTEREST

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Appendix. Supplementary material

Table 5.3: Spontaneous fermentation duration effects on pomegranate pericarp components.

Component	Fermentation duration									p
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
Extract yield (g/g dw)	0.50 ± 0.00	0.42 ± 0.00	0.32 ± 0.01	0.33 ± 0.00	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.28 ± 0.01	<b>&lt;0.001</b>
Ellagic acid (mg/g dw)	2.94 ± 0.08	11.71 ± 1.39	20.85 ± 2.29	17.23 ± 3.26	22.13 ± 2.78	24.79 ± 1.41	24.19 ± 1.00	17.60 ± 1.07	15.14 ± 1.36	<b>&lt;0.001</b>
Punicalagin (mg/g dw)	115.35 ± 7.30	85.73 ± 8.72	64.40 ± 1.04	51.75 ± 5.91	44.34 ± 2.04	28.41 ± 0.31	39.94 ± 1.32	23.60 ± 0.82	12.58 ± 0.21	<b>&lt;0.001</b>
Punicalin (mg/g dw)	2.25 ± 0.03	15.58 ± 0.47	46.99 ± 1.28	45.50 ± 6.39	61.24 ± 2.08	74.00 ± 0.56	69.38 ± 1.84	77.44 ± 4.85	74.24 ± 3.42	<b>&lt;0.001</b>
Total phenolic content (mg gae/g dw)	215.62 ± 13.00	210.83 ± 5.08	206.27 ± 7.80	206.35 ± 3.81	187.78 ± 5.57	203.59 ± 2.37	201.53 ± 11.28	171.74 ± 2.28	155.19 ± 11.77	<b>&lt;0.001</b>

The values are means ± standard errors of component analysis from 3 samples. Statistical significance of fermentation duration is given by one-way ANOVA Bonferroni-adjusted p values ( $p < 0.05$ ) in bold.

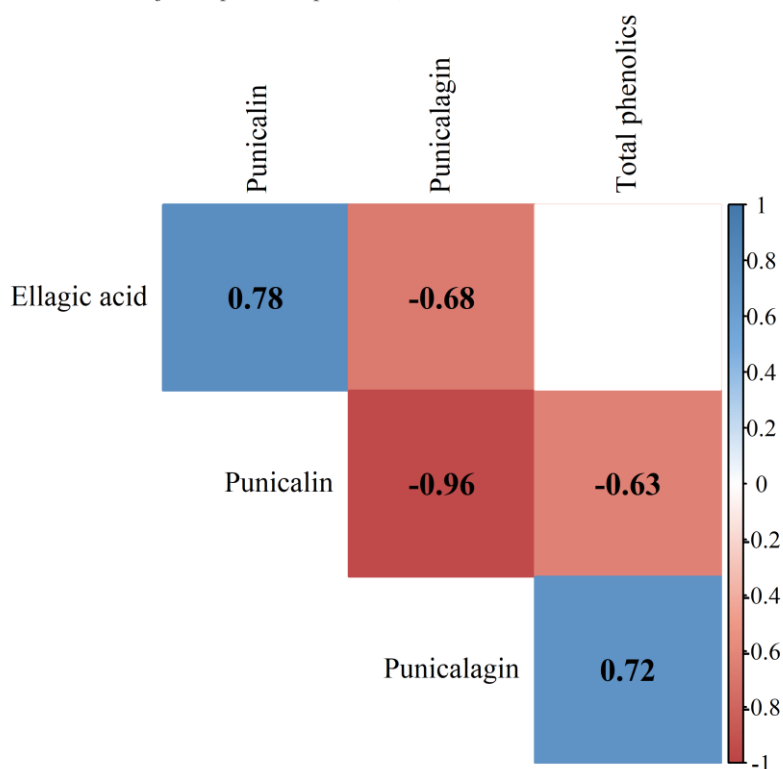


Figure 5.5: Correlations between phenolic contents from pomegranate pericarp over spontaneous fermentation. Linear correlations between phytochemicals are given by the Pearson correlation coefficients with significance level set at 0.05.

Table 5.4: Spontaneous fermentation duration effects on pomegranate seed press residue components.

Component	Fermentation duration									p
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
Oil yield (g/g dw)	0.10 ± 0.00	0.13 ± 0.00	0.12 ± 0.00	0.14 ± 0.00	0.14 ± 0.00	0.13 ± 0.00	0.18 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.04	<b>0.027</b>
Myristic acid C14:0 (%)	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	<b>&lt;0.001</b>
Palmitic acid C16:0 (%)	2.65 ± 0.01	3.03 ± 0.02	3.19 ± 0.09	3.34 ± 0.02	3.31 ± 0.02	3.34 ± 0.10	3.41 ± 0.01	3.44 ± 0.02	3.62 ± 0.02	<b>&lt;0.001</b>
Palmitoleic acid C16:1 (%)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.000
Stearic acid C18:0 (%)	1.81 ± 0.01	1.96 ± 0.01	1.95 ± 0.07	2.01 ± 0.02	2.00 ± 0.00	1.98 ± 0.07	2.03 ± 0.00	2.01 ± 0.01	2.02 ± 0.01	<b>&lt;0.001</b>
Oleic acid C18:1n-9 c (%)	5.66 ± 0.03	6.24 ± 0.03	6.19 ± 0.17	6.49 ± 0.02	6.48 ± 0.01	6.43 ± 0.19	6.59 ± 0.01	6.49 ± 0.03	6.61 ± 0.03	<b>&lt;0.001</b>
Linoleic acid C18:2n-6 c (%)	6.31 ± 0.05	7.27 ± 0.03	7.39 ± 0.27	7.85 ± 0.01	7.72 ± 0.03	7.78 ± 0.29	7.91 ± 0.02	8.03 ± 0.01	8.29 ± 0.04	<b>&lt;0.001</b>
α-Linolenic acid C18:3n-3 c (%)	0.06 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.10	0.14 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.19 ± 0.03	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.21 ± 0.01	<b>0.023</b>
Punicic acid C18:3n-5 c,t,c (%)	80.71 ± 0.20	78.54 ± 0.20	78.34 ± 0.29	77.12 ± 0.14	77.53 ± 0.15	77.44 ± 0.46	76.77 ± 0.06	77.21 ± 0.09	76.46 ± 0.06	<b>&lt;0.001</b>
Catalpic acid C18:3n-5 t,t,c (%)	0.99 ± 0.02	0.83 ± 0.07	0.88 ± 0.15	0.91 ± 0.04	0.74 ± 0.11	0.87 ± 0.12	0.90 ± 0.01	0.71 ± 0.03	0.83 ± 0.07	0.412
β-Eleostearic acid C18:3n-5 t,t,t (%)	0.71 ± 0.07	0.78 ± 0.07	0.68 ± 0.10	0.80 ± 0.04	0.72 ± 0.04	0.69 ± 0.05	0.83 ± 0.01	0.63 ± 0.01	0.61 ± 0.03	<b>0.026</b>
Arachidic acid C20:0 (%)	0.45 ± 0.00	0.52 ± 0.01	0.51 ± 0.02	0.53 ± 0.00	0.53 ± 0.00	0.53 ± 0.02	0.55 ± 0.00	0.53 ± 0.01	0.56 ± 0.01	<b>&lt;0.001</b>
Eicosenoic acid C20:1n-9 c (%)	0.42 ± 0.01	0.50 ± 0.00	0.45 ± 0.05	0.55 ± 0.02	0.53 ± 0.01	0.46 ± 0.05	0.56 ± 0.01	0.51 ± 0.01	0.51 ± 0.02	<b>&lt;0.001</b>
Behenic acid C22:0 (%)	0.21 ± 0.02	0.16 ± 0.00	0.22 ± 0.07	0.17 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.22 ± 0.08	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.20 ± 0.01	1.000
Lignoceric acid C24:0 (%)	0.00 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00	<b>&lt;0.001</b>

The values are means ± standard errors of components analysis from 3 samples and 2 samples for oil yield. Statistical significance of fermentation duration is given by one-way ANOVA Bonferroni-adjusted p values (p < 0.05) in bold.

## 5.2. Étude de la stabilisation des co-produits de grenade : impact sur leur composition chimique

### 5.2.1. Péricarpes

#### 5.2.1.a. Caractérisation des péricarpes après séchage à différentes températures

Les péricarpes de grenade obtenus industriellement ont été conditionnés par lyophilisation (témoins) et séchage en étuve ventilée à 40 et 70 °C, puis la matière broyée (n=3 par conditionnement) extraite au méthanol et les polyphénols totaux, la punicalagine, la punicaline et l'acide ellagique quantifiés par le dosage de Folin-Ciocalteu [289] et par chromatographie liquide haute performance (CLHP) comme décrit dans le chapitre 2.

Les résultats obtenus pour ces trois conditionnements sont donnés dans le tableau 5.5 et représentés sur la figure 5.6.

Tableau 5.5 : Composition en polyphénols des péricarpes de grenade après leur déshydratation.

Composition	Conditionnement			p cor. (H)
	Lyophilisation	Etuve ventilée (40°C)	Etuve ventilée (70°C)	
<i>dans les péricarpes</i>				
Rendement extrait (g/100g ms)	50 ± 0	39 ± 1	38 ± 1	<b>0,000</b>
Polyphénols totaux (mg eag/g ms)	215,6 ± 13,0	213,0 ± 3,7	160,8 ± 5,9	<b>0,000</b>
Punicalagine (mg/g ms)	115,4 ± 7,3	102,2 ± 5,8	84,9 ± 7,1	<b>0,032</b>
Punicaline (mg/g ms)	2,2 ± 0,0	1,9 ± 0,0	2,6 ± 0,1	<b>0,000</b>
Acide ellagique (mg/g ms)	2,9 ± 0,1	2,7 ± 0,1	2,6 ± 0,1	<b>0,035</b>
<i>dans l'extrait méthanolique</i>				
Polyphénols totaux extrait (g/100g ms)	42,9 ± 2,5	54,9 ± 0,6	42,8 ± 1,8	
Punicalagine extrait (g/100g ms)	23,0 ± 1,6	26,3 ± 2,0	22,6 ± 1,5	
Punicaline extrait (g/100g ms)	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,7 ± 0,0	
Acide ellagique extrait (g/100g ms)	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	

Les valeurs sont les moyennes ± écart-type de l'analyse de 3 échantillons. La significativité de la température de séchage est donnée par la p-valeur d'une analyse de la variance puis ajustée avec la correction de Holm (p cor. (H)).

Le rendement en extractibles au méthanol des co-produits lyophilisés, séchés à 40 et 70 °C est de 50 ± 0 %, 39 ± 1 % et 38 ± 1 %, respectivement. Sa valeur varie significativement entre les trois méthodes de séchage (p<0,001), la plus haute semble être pour la lyophilisation, et celles obtenues à 40 et 70 °C semblent similaires. Dans la littérature, l'extraction des péricarpes en mélange eau et méthanol (de 20 à 100 %) entraîne des rendements compris entre 17 et 46 % [127,166,304,305]. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature, et les paramètres d'extraction tels que l'emploi d'ultrasons, de différents ratio solide-liquide, température et durée d'extraction expliquent les différences observées.

La teneur en polyphénols totaux des péricarpes séchés se situe entre 160,8 ± 5,9 et 215,6 ± 13,0 mg eag/g ms, et est significativement impactée par la méthode de conditionnement (p<0,001). Elle semble très largement minimale après séchage

à 70 °C en étuve ventilée, avec une teneur de  $160,8 \pm 5,9$  mg eag/g ms, alors que la lyophilisation et le séchage à 40 °C entraînent des teneurs semblant proches de  $215,6 \pm 13,0$  et  $213,0 \pm 3,7$  mg eag/g ms. Ces teneurs sont du même ordre de grandeur que celles retrouvées dans la littérature 33-189 mg/g ms [166,304]. Les variations résultent de méthodes extractives différentes, mais aussi de la variété de grenade considérée [127], comme étudié dans le chapitre 3.

Pour les polyphénols ciblés, la teneur en punicalagine est en moyenne de  $100,8 \pm 14,5$  mg/g ms, la teneur en punicaline  $2,2 \pm 0,3$  mg/g ms et la teneur en acide ellagique de  $2,8 \pm 0,1$  mg/g ms. Les différences entre les méthodes de conditionnements semblent principalement résider dans la teneur en punicalagine, qui est maximale pour la lyophilisation et est diminuée de 11 et 26 % pour les séchages à 40 et 70 °C ( $p < 0,05$ ), avec respectivement  $115,4 \pm 7,3$ ,  $102,2 \pm 5,8$  et  $84,9 \pm 7,1$  mg/g ms. Les teneurs en punicaline et acide ellagique varient beaucoup moins en valeur absolue (mg/g ms) car comprises entre 2 et 3 mg/g ms. Cependant une diminution de 15 % et une augmentation de 13 % de la teneur en punicaline sont retrouvées après séchage à 40 °C et 70 °C comparé à la lyophilisation ( $p < 0,001$ ), avec des teneurs respectives  $1,9 \pm 0,0$ ,  $2,6 \pm 0,1$  et  $2,2 \pm 0,0$  mg/g ms. La teneur en acide ellagique diminue de 11 et 7 % après le séchage en étuve ventilée à 40 et 70 °C avec des valeurs respectives de  $2,7 \pm 0,1$  et  $2,6 \pm 0,1$  mg/g ms, pour une teneur de  $2,9 \pm 0,1$  mg/g ms après lyophilisation ( $p < 0,05$ ). Les teneurs des ellagitannins sont proches de celles retrouvées dans la littérature, avec par exemple une teneur en punicalagine de 98,0 mg/g ms et en acide ellagique de 12,5 mg/g ms dans un extrait méthanolique (80 % dans l'eau) de péricarpes [166]. La teneur des polyphénols varie fortement avec la variété de grenade, comme présenté dans le chapitre 3, ainsi que les paramètres d'extraction ce qui explique des écarts entre la littérature et les résultats présentés [142,171].

Pour l'ensemble des données, le modèle de l'analyse de la variance est significatif ( $p < 0,05$ ) pour chaque composant des péricarpes étudié. Par conséquent, le mode et la température de séchage (lyophilisation, étuve ventilée à 40 et 70 °C) ont un effet sur le rendement en extractibles au méthanol et les teneurs en polyphénols totaux, punicalagine, punicaline et acide ellagique des péricarpes de grenade. **Le conditionnement des péricarpes semble principalement affecter le rendement en extractibles, et les teneurs en polyphénols totaux et punicalagine, avec des variations maximales de l'ordre de 12 %, 34 % et 36 %, respectivement.**

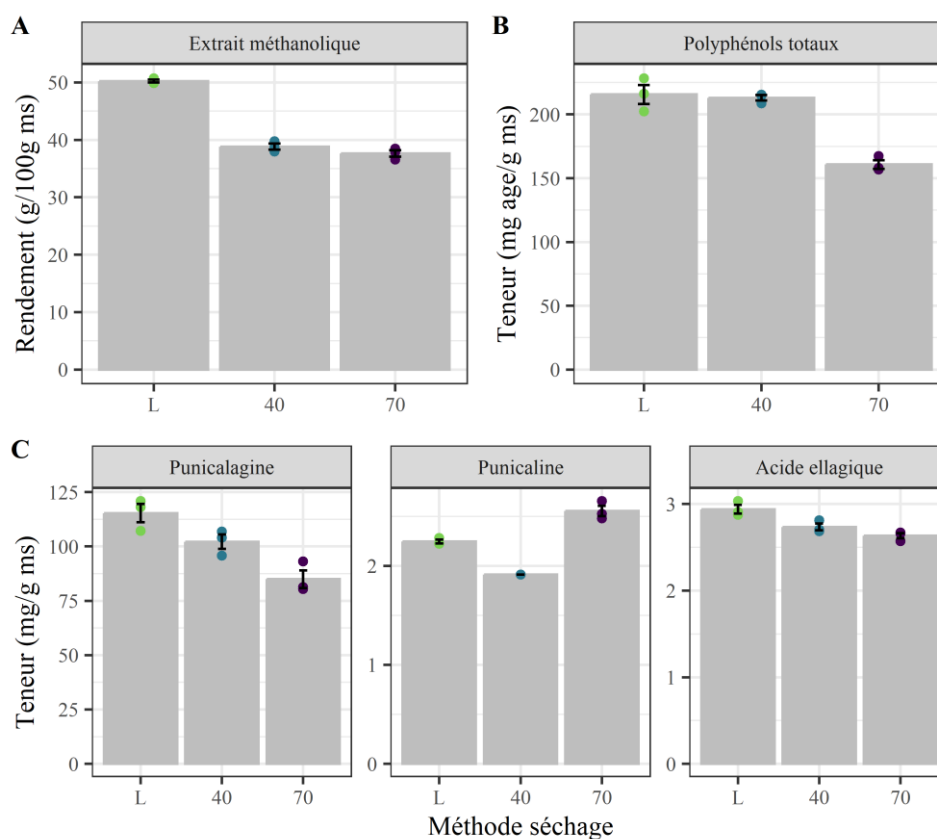


Figure 5.6 : Évolution des teneurs en polyphénols des péricarpes de grenade entre les méthodes de déshydratation. Les valeurs moyennes sont représentées par des barres grisées pour les trois conditions de séchage testées : lyophilisation (L, n=3), étuve ventilée à 40°C (40, n=3) et étuve ventilée à 70°C (70, n=3).

### 5.2.1.b. Relation entre la température de séchage et la composition chimique des péricarpes

Les températures étudiées sont 40 °C (n=3) et 70 °C (n=3), correspondant à celles appliquées lors du séchage en étuve ventilée, qui sont comparées à la lyophilisation (n=3), procédé pendant lequel la température n'excède pas 20 °C dans nos conditions. Afin de définir la relation entre ces températures de séchage et la composition des péricarpes en tenant compte à la fois du rendement en extractibles, la teneur en polyphénols totaux, punicalagine, punicaline et acide ellagique, une analyse en composante principale a été conduite avec les résultats précédents (9 individus, 5 variables). Les résultats de cette analyse sont représentés sur le tableau 5.6 et la figure 5.7.

Tableau 5.6 : Interprétabilité des composés analysés (variables) et du mode de déshydratation (facteur étudié) des péricarpes de grenade. Les valeurs propres et la significativité des composants (rendement d'extraction, teneurs en polyphénols totaux, punicalagine, punicaline et acide ellagique) et de la méthode de séchage (lyophilisation, étuve ventilée à 40 et 70 °C) sont donnés sur les composantes principales sélectionnées PC1 et PC2.

Variable	Code variable	PC1 (70,32%)	p (PC1)	PC2 (23,01%)	p (PC2)
<b>Variables étudiées</b>					
Extractibles totaux (g/100g ms)	rdt_meoh	0,83	<b>0,006</b>	0,54	0,132
Polyphénols totaux (mg eag/g ms)	TPC.mgg	0,93	<b>0,000</b>	-0,33	0,380
Punicalagine (mg/g ms)	teneur_pgin_mgg	0,92	<b>0,000</b>	0,06	0,882
Punicaline (mg/g ms)	teneur_plin_mgg	-0,59	0,097	0,80	<b>0,009</b>
Acide ellagique (mg/g ms)	teneur_ea_mgg	0,89	<b>0,001</b>	0,31	0,410
<b>Facteur étudié</b>					
Méthode séchage			<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	

La significativité des variables (composition chimique des péricarpes) et du facteur étudié (température de séchage) sur chaque composante (PC1 et PC2) est donnée par la p-valeur associée (p), en gras lorsque que celle-ci est sous le seuil de significativité (5 %).

Les deux composantes principales PC1 et PC2 expliquent 93 % de la variance totale entre les échantillons, et permettent d'interpréter les variations du rendement en extractible, des teneurs en polyphénols totaux, acide ellagique, punicaline et punicalagine des péricarpes liées à la température de séchage ( $p < 0,05$ ). Le rendement d'extraction et les teneurs en punicalagine, acide ellagique et polyphénols totaux semblent corrélés entre eux (figure 5.7). Cela pourrait indiquer que plus le taux de composés extrait est élevé, plus les teneurs en polyphénols totaux, acide ellagique et punicalagine le sont. A l'inverse, la teneur en punicaline semble corrélée négativement avec la teneur en polyphénols totaux et la teneur en punicalagine, suggérant que l'augmentation de la première est liée à une diminution des deux autres.

Les échantillons des péricarpes sont représentés de manière distincte les uns des autres, et forment trois groupes correspondant directement à la méthode de conditionnement, circonscrits sur la figure 5.7. Le séchage des péricarpes a par conséquent un impact sur leur composition chimique et les extractibles en fonction du mode de séchage et de la température. Les échantillons lyophilisés présentent un rendement en extraction, des teneurs en polyphénols totaux, acide ellagique et en punicalagine élevées. Le séchage à 70 °C des péricarpes entraîne une diminution de tous ces composants, en parallèle d'une augmentation de la teneur en punicaline. Enfin, les échantillons séchés à 40 °C correspondent plutôt aux valeurs centrales, avec une tendance à une faible teneur en punicaline et une teneur élevée en polyphénols totaux.

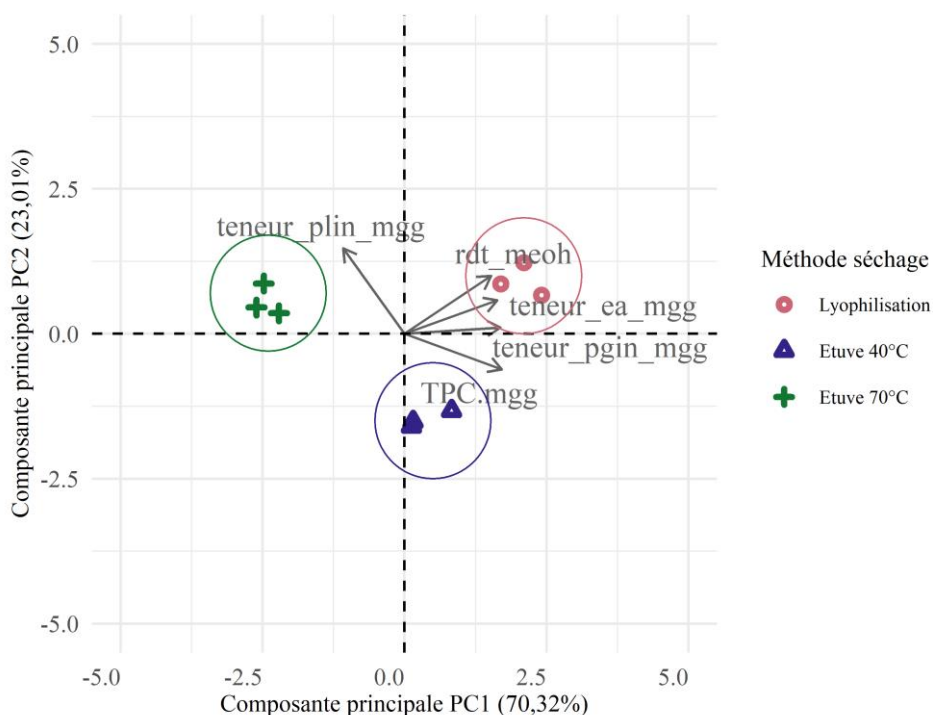


Figure 5.7 : Effet de la température de séchage en étuve ventilée des péricarpes de grenade obtenus industriellement sur leur composition chimique et comparaison à la lyophilisation. Représentation sur les deux composantes principales PC1 et PC2 des échantillons analysés de co-produits lyophilisés (cercle rose,  $n=3$ ), séchés en étuve ventilée à 40°C (triangle bleu,  $n=3$ ) et 70°C (croix verte,  $n=3$ ). Les vecteurs représentent les tendances observées du rendement en extractibles au méthanol (rdt\_meoh) et des teneurs en polyphénols totaux (TPC.mgg), acide ellagique (teneur\_ea\_mgg), punicalagine (teneur\_pgin\_mgg) et punicaline (teneur\_plin\_mgg).

Par comparaison avec la lyophilisation, sécher les co-produits à 40 °C diminue le rendement en extractibles de  $50 \pm 0$  à  $39 \pm 1$ , les teneurs en polyphénols individuels de  $115,4 \pm 7,3$ ,  $2,2 \pm 0,0$  et  $2,9 \pm 0,1$  à  $102,2 \pm 5,8$ ,  $1,9 \pm 0,0$  et  $2,7 \pm 0,1$  mg/g ms pour la punicalagine, la punicaline et l'acide ellagique respectivement, mais pas la teneur en polyphénols totaux, qui varie de  $215,6 \pm 13,0$  à  $213,0 \pm 3,7$  mg eag/g ms. L'augmentation de la température de séchage de 40 à 70 °C implique principalement une diminution des teneurs en polyphénols totaux et punicalagine, respectivement jusqu'à  $160,8 \pm 5,9$  mg eag/g ms et  $84,9 \pm 7,1$  mg/g ms, et une augmentation de la teneur en punicaline à  $2,6 \pm 0,1$  mg/g ms.

La diminution du rendement en extractibles au méthanol entre la lyophilisation et les deux séchages en étuve ventilée peut être liée à la dégradation de certains composés ou leur transformation entraînant une diminution de leur solubilité dans le solvant d'extraction. La variation de la teneur en métabolites des végétaux en fonction du mode et de la température de séchage a été largement étudiée et varie selon la matière et les procédés [413]. Par exemple, le séchage à 70 °C de la salicorne par rapport à la lyophilisation entraîne une diminution des protéines (-22 %), une augmentation des fibres diététiques (+8 %), des teneurs similaires en cendres, lipides totaux, glucides et une variation des profils d'acides gras (augmentation des acides gras saturés de 28 % à 43 % des acides gras totaux) et des composés volatiles (diminution des terpènes,



alcools, esters au profit d'acides carboxyliques, aldéhydes, hydrocarbures, lactones, cétones et pyrazines) [414]. Ces mêmes procédés appliqués au pois n'influencent pourtant pas les teneurs en protéines, lipides, fibre diététique, cendres et sucres mais augmentent le rendement en extractibles et polyphénols totaux [415]. Le séchage de matrices végétales implique des phénomènes complexes liés directement aux composants des cellules et une grande diversité de réactions peuvent être déclenchées selon les températures appliquées comme l'activation ou l'inactivation d'enzymes, l'oxydation des lipides, la conversion des sucres, ou la vaporisation des composés volatiles [413]. Par exemple, les diminutions observées des polyphénols caroténoïdes et chlorophylles des légumes verts au cours du séchage sont attribuées à la dégradation thermique, l'oxydation, l'isomérisation, alors que leur augmentation est attribuée à la rupture de complexes moléculaires, des parois cellulaires et à l'inactivation des enzymes oxydantes [416] liées, dans le cas du séchage, à la température, le temps d'exposition, le niveau d'oxygène et la lumière [417].

Les trois méthodes de déshydratation des co-produits de grenade employées dans ces travaux ont impliqué l'application d'une gamme de températures croissante, d'un flux d'air chaud (étuve) ou d'un vide (lyophilisation), et ont été menées dans l'obscurité pendant 24, 48 et 72 h pour respectivement l'étuve ventilée à 70 °C, 40 °C et la lyophilisation. Les co-produits secs ont ensuite été conservés à l'abri de la lumière dans des sacs plastiques perméables à l'air jusqu'aux analyses ultérieures, et ont donc été exposés à l'oxygène à température ambiante pendant des durées similaires. Parmi les facteurs générant des altérations dans la matrice végétale, la température de séchage explique donc les différences observées de rendement en extractibles au méthanol.

Au vu de la faible diminution de la teneur en polyphénols totaux après le séchage à 40 °C associée à une diminution du rendement d'extraction, il semblerait que les polyphénols ne soient pas les composés altérés par le séchage à 40 °C. L'effet du mode et de la température de séchage sur les extractibles des péricarpes de grenade n'a pas été décrit à notre connaissance, mais centré sur les teneurs en polyphénols et l'activité antioxydante des extraits. Dans ces études, le séchage en étuve ventilée comparé à la lyophilisation et l'augmentation de la température de séchage diminuent la teneur en polyphénols totaux des péricarpes de grenade [228,229,232,418] ce qui est cohérent avec nos résultats.

La diminution des teneurs en punicalagine, punicaline et acide ellagique et le maintien de la teneur en polyphénols totaux après séchage à 40 °C suggère que parmi les polyphénols des péricarpes, certains types seraient moins affectés par le séchage à 40 °C. L'étude de Patrón-Vázquez et al. [419] de l'effet du séchage sur les polyphénols de co-produits de citron montre une variation non linéaire de la teneur en polyphénols totaux en fonction de la température (40-110 °C), avec des augmentations et diminutions successives, expliquée par les variations des composés individuels. Les teneurs en acides phénoliques (cafféique et sinapique) augmentent avec la température de séchage, alors que celles de certains flavonoïdes glycosylés (ériocitrine, hespéridine) diminuent, et l'évolution des teneurs de la naringine et de son dérivé aglycone (naringinine) n'est pas fonction de la température de séchage. Ces différentes évolutions observées résultent de la grande variabilité de structure existant au sein de la famille des polyphénols engendrant de nombreuses possibilités de réactions avec des vitesses et des réactants variables. Celles-ci se produisent entre

polyphénols [420] mais aussi avec les composés présents dans la matière comme les protéines, les sucres, les composés carbonylés ou les lipides oxydés [421].

La diminution drastique de la teneur en polyphénol totaux lors de l'augmentation entre 40 et 70 °C semble indiquer une température limite à partir de laquelle l'ensemble des polyphénols sont impactés par le séchage. En solution aqueuse, la teneur en ellagitannin diminue à partir de 60 °C selon la durée d'incubation et l'acidité du milieu. En milieu acide, le mécanisme de cette dégradation implique l'hydrolyse des composés puis l'oxydation des intermédiaires finaux [422]. La dégradation des ellagitannins pourrait aussi résulter d'une réaction enzymatique. Les deux principales enzymes présentes dans la grenade conduisant à l'oxydation des polyphénols sont les *polyphénol oxydase* et *peroxydase* dont les structures sont dénaturées à 70 °C, avec une activité résiduelle respectivement de moins de 10 % et 20 % [423]. L'augmentation de la teneur en punicalines après séchage à 70 °C en parallèle de la diminution de la punicalagine et des polyphénols totaux montre donc une oxydation ou une hydrolyse de la punicalagine et autres ellagitannins liée à la température de séchage et à l'air. La différence structurelle entre la punicalagine et la punicaline réside dans les substituants présents autour de l'hexose central. La punicalagine contient un groupement 2,3-hexahydroxydiphenoyl (2,3-HHDP) et un groupement 4,6-gallagyl alors que la punicaline contient uniquement le groupement 4,6-gallagyl. La punicaline peut donc être formée à partir de la rupture des liaisons esters du groupement 2,3-HHDP de la punicalagine. Cette rupture a déjà été démontrée en milieu basique avec peu d'oxygène [424] mais aussi en milieu neutre ou faiblement acide [56].

## 5.2.2. Co-produit de pressage des graines

### 5.2.2.a. Composition des co-produits après séchage à différentes températures

Comme pour les péricarpes, les co-produits de pressage des graines de grenade obtenus industriellement ont été conditionnés par lyophilisation (n=3) et séchage en étuve ventilée à 40 (n=3) et 70 °C (n=3) durant une première campagne en 2019. Les résultats de l'évaluation de la teneur en lipides de ces co-produits sont donnés dans le tableau 5.7 et sur la figure 5.8.

La teneur en huile des co-produits internes est en moyenne de  $11 \pm 2$  g/g ms, avec des variations de l'ordre de 1 % entre les trois méthodes de conditionnement. Dans la littérature, peu d'études ont porté sur l'extraction de l'huile des co-produits de pressage des graines de grenade et ont effectué une première étape de lavage pour analyser uniquement la partie interne de la graine. Gungor et al. [408] ont montré un rendement de 12 % dans les co-produits, proche de notre valeur, alors que d'autres études sur la partie interne de grenade ont observé des rendements plus élevés et compris entre 17 et 23 % [88,394].

L'acide punique (C18:3n-5, etc) représente plus de 78 % des acides gras totaux quelle que soit la méthode de conditionnement, et diminue de 2 et 3 % après séchage à 40 et 70 °C, respectivement, comparé à la lyophilisation, avec des teneurs relatives respectives de , et %. Les acides oléique (C18:1n-9) et linoléique (C18:2n-6) représentent entre 5 et 7 % des acides gras totaux dans les co-produits de pressage conditionnés, et les acides palmitique (C16:0) et stéarique (C18:0) avec des teneurs relatives comprises entre 1 et 3 %. Les co-produits de pressage des graines de grenade

sont donc composés principalement d'acides gras en C18 prédominés par l'acide punique, ce qui est cohérent avec les données de la littérature, bien que situé dans les teneurs élevées [88,394].

Tableau 5.7 : Composition des co-produits de pressage des graines de grenade après leur déshydratation.

Composition	Conditionnement			p cor. (H)
	Lyophilisation	Etuve ventilée (40°C)	Etuve ventilée (70°C)	
Rendement huile (g/100g ms)	10 ± 0	11 ± 0	11 ± 3	0,681
Acide myristique C14:0 (%)	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,681
Acide palmitique C16:0 (%)	2,65 ± 0,01	2,84 ± 0,01	2,91 ± 0,03	<b>0,000</b>
Acide palmitoléique C16:1n-7 (%)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	
Acide stéarique C18:0 (%)	1,81 ± 0,01	1,96 ± 0,01	2,02 ± 0,01	<b>0,000</b>
Acide oléique C18:1n-9 c (%)	5,66 ± 0,03	6,11 ± 0,02	6,29 ± 0,05	<b>0,000</b>
Acide linoléique C18:2n-6 c (%)	6,31 ± 0,05	6,90 ± 0,03	7,02 ± 0,05	<b>0,000</b>
Acide α-linolénique C18:3n-3 c (%)	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,681
Acide punique C18:3n-5 c,t,c (%)	80,71 ± 0,20	79,00 ± 0,09	78,27 ± 0,03	<b>0,000</b>
Acide catalpique C18:3n-5 t,t,c (%)	0,99 ± 0,02	1,03 ± 0,06	1,19 ± 0,06	<b>0,036</b>
Acide β-éléostéarique C18:3n-5 t,t,t (%)	0,71 ± 0,07	0,95 ± 0,05	1,05 ± 0,03	<b>0,009</b>
Acide arachidique C20:0 (%)	0,45 ± 0,00	0,50 ± 0,01	0,51 ± 0,03	0,065
Acide eicosénoïque C20:1n-9 c (%)	0,42 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,51 ± 0,01	<b>0,000</b>
Acide béhénique C22:0 (%)	0,21 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,13 ± 0,01	<b>0,000</b>
Acide lignocérique C24:0 (%)	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,03	0,140

Les valeurs sont les moyennes ± écart-type de l'analyse de 3 échantillons, et 2 échantillons pour le rendement en huile. La significativité de la température de séchage est donnée par la p-valeur d'une analyse de la variance en gras ajustée avec la correction de Holm (p cor. (H)).

Pour la composition des co-produits de pressage, le modèle de l'ANOVA est significatif ( $p < 0,05$ ) pour les acides palmitique, stéarique, oléique, linoléique, punique et ses isomères catalpique et β-éléostéarique, eicosénoïque et béhénique. Leurs teneurs sont par conséquent influencées par la méthode de séchage, à l'inverse du rendement en huile et des teneurs des autres acides gras qui ne varient pas.

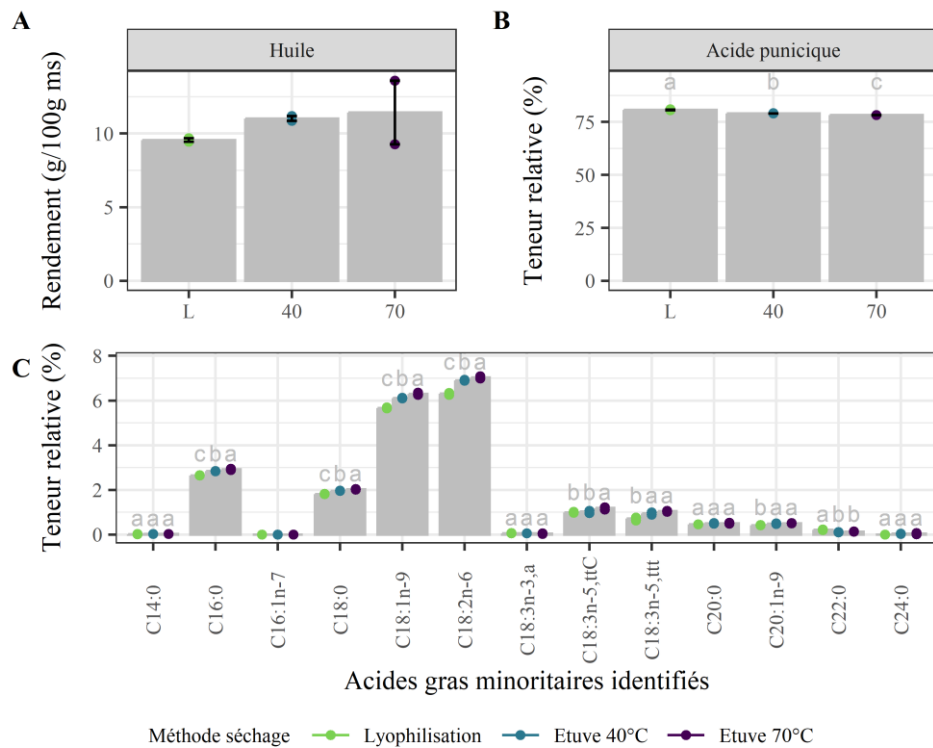


Figure 5.8 : Évolution des teneurs en huile (A) et en acides gras (B,C) des co-produits de pressage des graines de grenade au cours de leur séchage. Les valeurs moyennes sont représentées par des barres grisées pour les trois conditions de séchage testées : lyophilisation (L, n=3), étuve ventilée à 40°C (40, n=3) et étuve ventilée à 70°C (70, n=3).

### 5.2.2.b. Relation entre l'élévation de la température de séchage et la composition des co-produits

Une analyse en composantes principale a été menée à partir des données de la composition chimique des co-produits de pressage des graines pour définir l'influence du mode et de la température de séchage sur le rendement en huile et le profil d'acides gras des co-produits. L'acide palmitoléique (C16:1n-7) a été enlevé du jeu de données car ne varie pas entre les lots de matière. Les températures étudiées sont 40 °C (n=3) et 70 °C (n=3), correspondant à celles appliquées lors du séchage en étuve ventilée, qui sont comparées à la lyophilisation (n=3), procédé pendant lequel la température n'excède pas 20 °C dans nos conditions. Les résultats sont présentés sur le tableau 5.8 et la figure 5.9.

Les deux premières composantes PC1 et PC2 représentent respectivement 76,2 et 12,2 % de la variance entre les échantillons, pour un total de 88,8 %. La température de séchage explique les variations entre les échantillons uniquement sur la composante principale PC1 ( $p < 0,05$ ) qui est donc pertinente à analyser.

Tableau 5.8 : Interprétabilité des composés analysés (variables) et du mode de déshydratation (facteur étudié) des co-produits de pressage des graines de grenade. Les valeurs propres et la significativité des composants (rendement en huile et profil d'acides gras) et du mode de séchage (lyophilisation, étuve ventilée à 40 et 70°C) sont donnés sur les composantes principales sélectionnées PC1 et PC2.

Variable	Code variable	PC1 (76,22%)	p (PC1)	PC2 (12,55%)	p (PC2)
<b>Variabiles étudiées</b>					
Teneur en huile (g/100g ms)	teneur_huile_g_g_dw	0,73	<b>0,025</b>	-0,60	0,087
Acide myristique (%)	c14_0	0,66	0,055	-0,58	0,104
Acide palmitique (%)	c16_0	0,98	<b>0,000</b>	0,14	0,717
Acide stéarique (%)	c18_0	0,98	<b>0,000</b>	0,10	0,801
Acide oléique (%)	c18_1n_9	0,98	<b>0,000</b>	0,10	0,789
Acide linoléique (%)	c18_2n_6	0,99	<b>0,000</b>	0,06	0,879
Acide $\alpha$ -linoléique (%)	c18_3n_3_a	-0,58	0,105	0,74	<b>0,022</b>
Acide punicique (%)	c18_3n_5_ctc	-0,99	<b>0,000</b>	-0,07	0,849
Acide catalpique (%)	c18_3n_5_ttc	0,77	<b>0,015</b>	-0,28	0,459
Acide $\beta$ -éléostéarique (%)	c18_3n_5_ttt	0,96	<b>0,000</b>	0,04	0,914
Acide arachidique (%)	c20_0	0,83	<b>0,005</b>	0,48	0,191
Acide eicosénoïque (%)	c20_1n_9	0,97	<b>0,000</b>	0,18	0,640
Acide béhénique (%)	c22_0	-0,86	<b>0,003</b>	-0,16	0,689
Acide lignocérique (%)	c24_0	0,80	<b>0,010</b>	0,30	0,425
<b>Facteur étudié</b>					
Méthode séchage			<b>0,000</b>		0,632

La significativité des variables (composition chimique des co-produits) et du facteur étudié (mode de séchage) sur chaque composante (PC1 et PC2) est donnée par la p-valeur associée (p), en gras lorsque que celle-ci est sous le seuil de significativité (5 %).

L'acide punicique (C18:3n-5,ctc) et l'acide béhénique (C22:0) sont corrélés négativement avec le rendement en huile et les teneurs en acides palmitique (C16:0), stéarique C18:0, oléique C18:1n-9, linoléique C18:2n-6, catalpique C18:3n-5,ttc,  $\beta$ -éléostéarique C18:3n-5,ttt, arachidique (C20:0), eicosénoïque (C20:1n-9) et lignocérique (C24:0). Cela semble suggérer que lorsque les teneurs en acides punicique et béhénique diminuent, le rendement en huile et les teneurs des autres acides gras augmentent, à l'exception des teneurs en acides myristique (C14:0) et  $\alpha$ -linoléique (C18:3n-3). Ces dernières n'expliquent pas les différences entre les méthodes de conditionnement, ce qui est cohérent avec les résultats présentés précédemment, c'est à dire que la méthode de conditionnement n'a pas d'effet significatif sur celles-ci.

Les co-produits lyophilisés montrent les teneurs les plus élevées en acides punicique et béhénique, ceux séchés à 40 °C des teneurs intermédiaires, et ceux séchés à 70 °C les teneurs les plus faibles. Par conséquent, les modes et température de séchage sont répartis, dans l'ordre décroissant de teneur en acides punicique et béhénique, de la lyophilisation au séchage à 40 puis 70 °C. D'après leurs relations avec les autres acides gras et le rendement en huile, **l'augmentation de la température de séchage semble donc entraîner une diminution des teneurs en acides punicique et béhénique au profit du rendement en huile et des teneurs en acides gras saturés à 16, 18, 20 et**

**24 carbones et de leurs dérivés insaturés à 18 et 20 carbones.** Fawole et al. [425] ont aussi comparé des méthodes de déshydratation des co-produits de grenade, et ont montré que la lyophilisation engendre des teneurs en acides punicoïque et béhénique plus élevées et des teneurs en huile, acides oléique, linoléique et autres saturés plus faibles que le séchage en étuve à 40 °C.

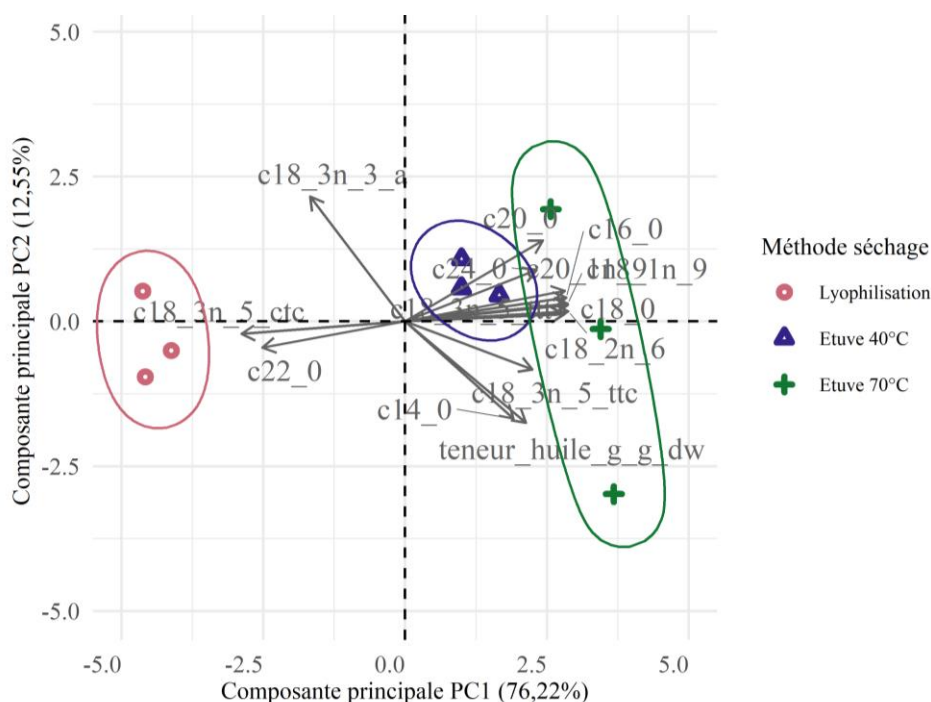


Figure 5.9 : Effet de la température de séchage en étuve ventilée des co-produits de pressage des graines de grenade sur leur composition chimique et comparaison à la lyophilisation. Représentation sur les deux composantes principales PC1 et PC2 des échantillons analysés de co-produits lyophilisés (cercle rose,  $n=3$ ), séchés en étuve ventilée à 40°C (triangle bleu,  $n=3$ ) et 70°C (croix verte,  $n=3$ ). Les vecteurs représentent les tendances observées du rendement en huile (*teneur\_huile\_g\_g\_dw*) et des teneurs en acides gras dont les abréviations sont données dans le tableau 5.8 précédent.

La diminution de la teneur relative en acide punicoïque peut s'expliquer par son isomérisation en acides catalpique et  $\beta$ -éléostéarique avec une augmentation de la température, comme démontré lors du chauffage de l'huile de grenade [426]. En effet, l'acide punicoïque est un isomère *cis,trans,cis* ce qui lui confère moins de stabilité que les acides catalpique et  $\beta$ -éléostéarique de configurations respectives *trans,trans,cis* et *trans,trans,trans*. Plusieurs études portant sur des triglycérides d'acides gras insaturés concordent sur la transformation des doubles liaisons *cis* vers *trans* induite par le chauffage [427,428]. La réaction d'isomérisation résulterait d'une réaction des acides gras avec des radicaux libres présents [427].

Cette diminution peut aussi être liée à d'autres réactions d'oxydation, des réarrangements et dimérisation [429]. En effet, les acides gras linoléiques conjugués ont été décrits comme plus sensibles à l'oxydation que les non conjugués et mono-insaturés [364]. Dans notre cas, cela explique que la teneur en acide punicoïque varie fortement par rapport aux autres acides gras présents. La somme des teneurs des trois isomères oméga-5 (acides punicoïque, catalpique et  $\beta$ -éléostéarique) des échantillons déshydratés, c'est-à-dire la teneur en acides gras poly-insaturés conjugués (AGPC), varie en moyenne de 82,4 à 81,0 et 81,0 % quand la température augmente de

20 °C (lyophilisation) à 40 °C et 70 °C. La teneur des AGPC semble donc diminuer légèrement de 1 à 2 % avec l'élévation de la température parmi l'ensemble des acides gras identifiés. Les faibles variations observées des teneurs en acides gras peuvent résulter de la méthode de quantification de ceux-ci. En effet, le profil en acides gras est établi à partir des teneurs relatives à l'ensemble des acides gras. Si la teneur en acides gras saturé, mono et di-insaturé reste constante et que celle en acide punicique diminue fortement, les teneurs relatives de ces acides gras peuvent paraître plus grandes relativement à l'ensemble.

Ces variations du profil d'acides gras sont relativement négligeables étant donné qu'elles correspondent à moins de 5 % de différence entre les trois conditionnements. Le rendement en huile est aussi faiblement affecté avec une augmentation de 1 % entre les trois méthodes. Ces résultats suggèrent donc que la composition en lipides des co-produits de pressage des graines se maintient avec l'augmentation de la température de séchage de 40 à 70 °C, et reste proche de celle des co-produits lyophilisés. Contrairement aux péricarpes, les co-produits de pressage des graines peuvent être conditionnés en étuve ventilée tout en maintenant leur qualité en terme de rendement en huile et de profil d'acides gras.

### 5.3. Diminution de la durée de séchage par voie thermique des co-produits de pressage des graines

La sensibilité des polyphénols des péricarpes à la température de séchage démontrée précédemment a conduit à la sélection des co-produits de pressage des graines uniquement pour une seconde campagne, en raison de la plus faible sensibilité des lipides. Cette deuxième campagne a été menée en 2021 avec les co-produits de pressage des graines obtenus industriellement à partir d'un mélange de variétés, pour évaluer l'impact de l'augmentation de la température et de l'utilisation d'un sécheur en continu sur la durée de séchage et sur la composition chimique des co-produits.

#### 5.3.1. Étude de l'impact du séchage en étuve ventilée

Dans un premier temps, l'effet de l'augmentation de la température de séchage de 40 à 150 °C en étuve ventilée a été évalué sur la teneur en matière sèche. Les co-produits ont été séchés en étuve à 40 (n=2), 70 (n=3), 100 (n=1) et 150 °C (n=1), et la teneur en matière sèche évaluée sur des échantillons prélevés au cours de la déshydratation.

La déshydratation des végétaux est étudiée généralement à l'aide du ratio d'humidité (MR, sans unité) [430] calculé à partir de l'humidité initiale ( $M_0$ ), à l'instant  $t$  ( $M_t$ ) et à l'équilibre ( $M_e$ ) comme présenté ci-dessous.

$$MR = \frac{M_t - M_e}{M_0 - M_e}$$

Avec:

$MR$ : ratio d'humidité, sans unité

$M_t$ : taux d'humidité à  $t$ , %g/g

$M_0$ : taux d'humidité initial, %g/g

$M_e$ : taux d'humidité à l'équilibre, % g/g

Le taux d'humidité à l'équilibre est souvent négligé car tend vers zéro lorsque la durée de séchage tend vers l'infini, et représente donc une valeur très faible comparée aux taux d'humidité initial et à la durée  $t$ .

Les cinétiques du séchage de la matière végétale peuvent se décomposer en trois phases principales. La première phase correspond à une vitesse de déshydratation constante et élevée, le taux d'humidité décroît très fortement. Cette phase est généralement rapide pour les fruits et légumes et s'achève lorsque que la surface et l'air ambiant sont à l'équilibre. Pendant les phases suivantes, le séchage de la matière ralentit car est limité principalement par la diffusion au sein de la matrice. Les données empiriques montrent que le séchage des matrices végétales s'effectue majoritairement pendant ces deux dernières phases [430]. De nombreux modèles ont été utilisés pour décrire le séchage des matières végétales et dépendent de plusieurs facteurs dont la méthode de séchage et la matière première employées. En pratique, différents modèles sont comparés et le meilleur est sélectionné en fonction de son adéquation avec les données empiriques.

La phase du séchage des co-produits de pressage d'intérêt dans le cas de notre étude et celle permettant d'obtenir une humidité inférieure à 15 %, ou une teneur en matière sèche supérieure à 85 %, pour limiter la croissance de micro-organismes. Les évolutions du taux de matière sèche et du ratio d'humidité des co-produits au cours du séchage aux différentes températures sont présentées sur la figure 5.10.

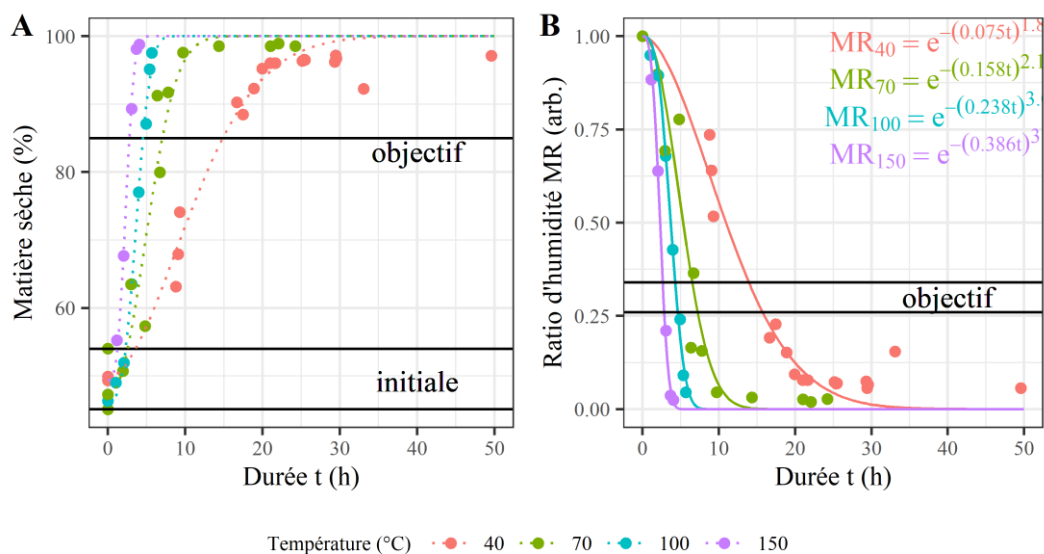


Figure 5.10 : *Durée minimale de séchage en étuve ventilée des co-produits de pressage des graines pour leur conservation longue durée.* L'évolution de la teneur en matière sèche des co-produits de pressage des graines séchés en étuve ventilée entre 40 et 150°C (A) a permis l'élaboration d'un modèle de cinétique de séchage (B) à partir du ratio d'humidité issu des teneurs en matière sèche désirée ("objectif") et initiale ("initiale"). Les températures de séchage sont représentées en rouge pour 40°C ( $n=2$ , 7 mesures), vert pour 70°C ( $n=3$ , 3, 6 et 7 mesures), bleu pour 100°C ( $n=1$ , 8 mesures) et violet pour 150°C ( $n=1$ , 6 mesures).

La teneur en matière sèche (85 %) à atteindre ("objectif") est reportée en termes de ratio d'humidité dans un intervalle ciblé à cause de la variabilité du taux de matière sèche initial. En effet, avec une matière sèche comprise entre 43 et 56 % initialement,



soit un taux d'humidité compris entre 57 et 44 %, le ratio d'humidité minimal visé est compris entre 0,26 et 0,34, ce qui correspond à un taux de matière sèche final de 85 %.

Les durées minimales du séchage pour atteindre l'objectif de ratio d'humidité ont été déduites du modèle de Page [431] décrit ci-dessous, au vu de son adéquation avec le ratio d'humidité dans la phase du séchage correspondant à l'objectif.

$$MR = e^{-kt^n}$$

Avec:

- MR*: ratio d'humidité, sans unité
- k*: constante empirique,  $h^{-n}$
- t*: durée séchage, *h*
- n*: constante empirique, sans unité

Les durées minimales nécessaires pour atteindre le ratio d'humidité ciblé (0,26-0,34) sont de 14,2-16,0, 6,3-7,0, 4,3-4,6 et 2,7-2,9 h pour les températures de 40, 70, 100 et 150 °C respectivement. Comme attendu, la durée de séchage diminue avec l'augmentation de la température. Ces résultats mettent en lumière une réduction considérable du temps de séchage des co-produits qui pourraient être stabilisés à une humidité inférieure à 15 % en étuve ventilée dans la journée suivant leur production.

Cependant, la teneur en huile et le profil d'acides gras des co-produits constitue une priorité face à durée de mise en œuvre. L'effet de l'augmentation de la température de séchage de 40 à 150 °C a donc été évalué sur la composition en lipides des co-produits de pressage. Cette composition est affectée par la fermentation anaérobie comme démontré précédemment, donc seuls les lots de co-produits conservés moins d'une semaine avant leur séchage sont décrits (40, 70 et 150 °C, 3 échantillons par essai). Les résultats sont présentés dans le tableau 5.9 et la figure 5.11.

Tableau 5.9 : Composition des co-produits de pressage des graines de grenade après séchage en étuve ventilée, campagne 2021.

Composition	Conditionnement			
	Etuve 40°C	Etuve 70°C	Etuve 150°C	p cor. (H)
Rendement huile (g/100g ms)	21 ± 1	19 ± 0	18 ± 1	0,112
Acide myristique C14:0 (%)	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,480
Acide palmitique C16:0 (%)	2,73 ± 0,01	2,77 ± 0,00	2,80 ± 0,00	<b>0,044</b>
Acide palmitoléique C16:1n-7 (%)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	
Acide stéarique C18:0 (%)	1,81 ± 0,01	1,84 ± 0,01	1,84 ± 0,01	0,480
Acide oléique C18:1n-9 c (%)	4,79 ± 0,01	4,79 ± 0,01	4,90 ± 0,01	<b>0,044</b>
Acide linoléique C18:2n-6 c (%)	5,95 ± 0,01	5,86 ± 0,02	6,36 ± 0,01	<b>0,001</b>
Acide α-linolénique C18:3n-3 c (%)	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,480
Acide punicoïque C18:3n-5 c,t,c (%)	82,55 ± 0,07	82,43 ± 0,01	80,98 ± 0,12	<b>0,007</b>
Acide catalpique C18:3n-5 t,t,c (%)	0,51 ± 0,02	0,53 ± 0,00	1,12 ± 0,01	<b>0,001</b>
Acide β-éléostéarique C18:3n-5 t,t,t (%)	0,54 ± 0,04	0,58 ± 0,01	0,78 ± 0,07	0,242
Acide arachidique C20:0 (%)	0,41 ± 0,00	0,42 ± 0,00	0,42 ± 0,00	0,349
Acide eicosénoïque C20:1n-9 c (%)	0,40 ± 0,00	0,42 ± 0,00	0,41 ± 0,01	0,480
Acide béhénique C22:0 (%)	0,22 ± 0,00	0,23 ± 0,02	0,26 ± 0,00	0,240
Acide lignocérique C24:0 (%)	0,02 ± 0,03	0,07 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,480

Les valeurs sont les moyennes ± écart-type de l'analyse de 2 échantillons. La significativité de la température de séchage est donnée par la p-valeur d'une analyse de la variance en gras ajustée avec la correction de Holm (p cor. (H)).

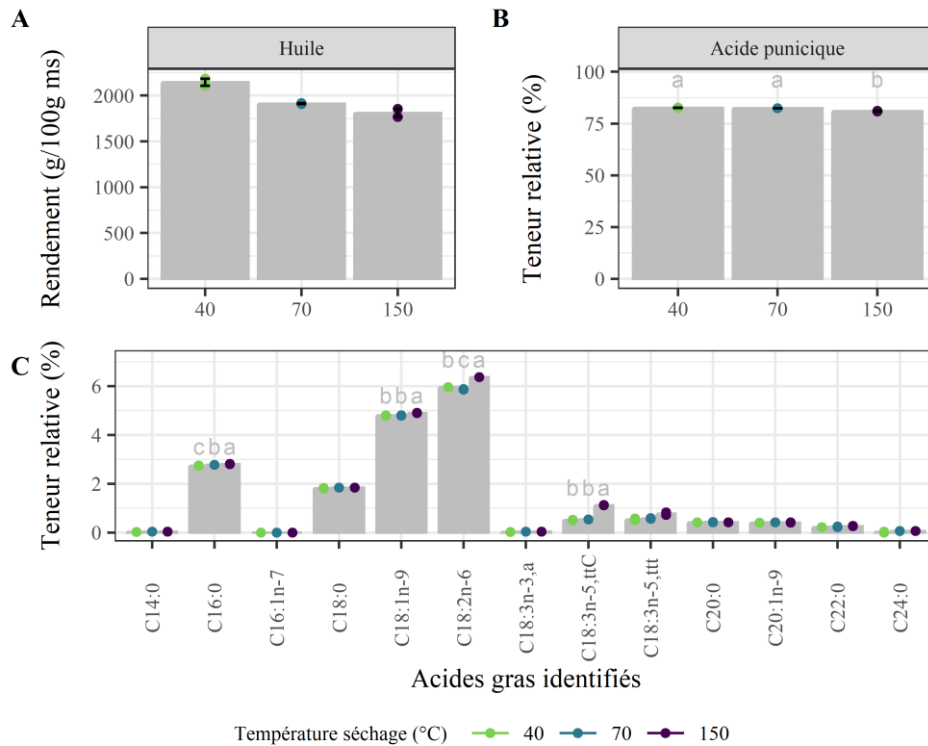


Figure 5.11 : Évolution des teneurs en huile (A) et acides gras (B,C) des co-produits de pressage des graines de grenade après séchage en étuve ventilée, campagne 2021. Le rendement en huile et les teneurs en acides gras moyennes sont représentées par les barres grises et les points correspondant aux températures de séchage de 40 °C en vert (n=3), 70°C en bleu (n=3) et 150°C en violet (n=3).

Le rendement en huile est compris entre 18 et 21 %, et le profil d'acides gras est dominé par l'acide punicoïque (C18:3n-5,ttc) avec des teneurs comprises entre 81 et 83 %. Leurs teneurs maximales sont obtenues après séchage à 40 °C, et semblent diminuer légèrement (2 %) avec l'augmentation de la température jusqu'à 150 °C ( $p < 0,05$  et  $p < 0,01$ , respectivement). Les acides palmitique (C16:0), stéarique (C18:0), oléique (C18:1n-9), et linoléique (C18:2n-6) sont retrouvés à des teneurs comprises entre 2,7-2,8 %, 1,8 %, 4,8-4,9 %, et 5,9-6,4 %, respectivement. Les autres acides gras identifiés sont présents à une teneur relative inférieure à 1 %. Les teneurs relatives en acides palmitique (C16:0), oléique (C18:1n-9), linoléique (C18:2n-6), catalpique (C18:3n-5,ttc) et  $\beta$ -éléostéarique (C18:3n-5 t,t,t) sont affectées significativement par la température de séchage ( $p < 0,05$ ). Leurs teneurs évoluent respectivement de 2,7, 4,8, 6,0, 0,5 et 0,5 % à 2,8, 4,9, 6,4, 1,1 et 0,8 % entre 40 et 150 °C, ce qui correspond à des variations faibles, respectivement de +0,1 %, +0,1 %, +0,4 %, +0,5 %, et +0,3 %.

Les résultats de cette campagne sont cohérents avec celle de 2019, pour laquelle l'augmentation de la température a entraîné une diminution faible de la teneur en acide punicoïque, une augmentation négligeable des autres acides gras et n'a pas affecté le rendement en huile. Les co-produits de la campagne de 2019 et 2021 n'ont pas été obtenus à partir du même mélange de variétés de grenade, ce qui peut expliquer en partie les différences de composition. Par exemple, le rendement en huile a été évalué à 11 % en 2019 et 21 % en 2021 lors du séchage à 40 °C, et la teneur en acide punicoïque à 79,0 et 82,6 % respectivement en 2019 et 2021 dans les mêmes conditions de séchage. Dans la littérature et le premier chapitre de ce manuscrit, des écarts du même ordre de grandeur sont retrouvés entre les différentes variétés de grenade [193]. Bien

que la composition des co-produits de pressage des graines ait évolué entre les deux années, l'effet de la température est resté le même ce qui confirme les résultats précédents. Par conséquent, l'augmentation de la température de séchage en étuve ventilée à 150 °C réduit la durée de séchage par 5, n'influence pas le rendement en huile extraite, diminue de moins de 2 % la teneur relative de l'acide punicique, l'acide gras majoritaire, et pourrait donc être employée dans le procédé de valorisation des co-produits de pressage des graines.

### 5.3.2. Étude de l'impact du séchage en sécheur à tapis

De nombreux procédés ont été mis au point pour réduire la durée de séchage des matières végétales. Parmi ceux-ci, le sécheur à tapis a l'avantage d'être un procédé en continu permettant un séchage uniforme et rapide. L'étude de l'effet de ce procédé sur les co-produits de pressage des graines de grenade a été menée lors de la campagne 2021 par lot de 25 kg. Le suivi de l'évolution de la teneur en matière sèche et du ratio d'humidité des co-produits au cours du séchage à des températures de 70 à 160 °C est présenté sur la figure 5.12.

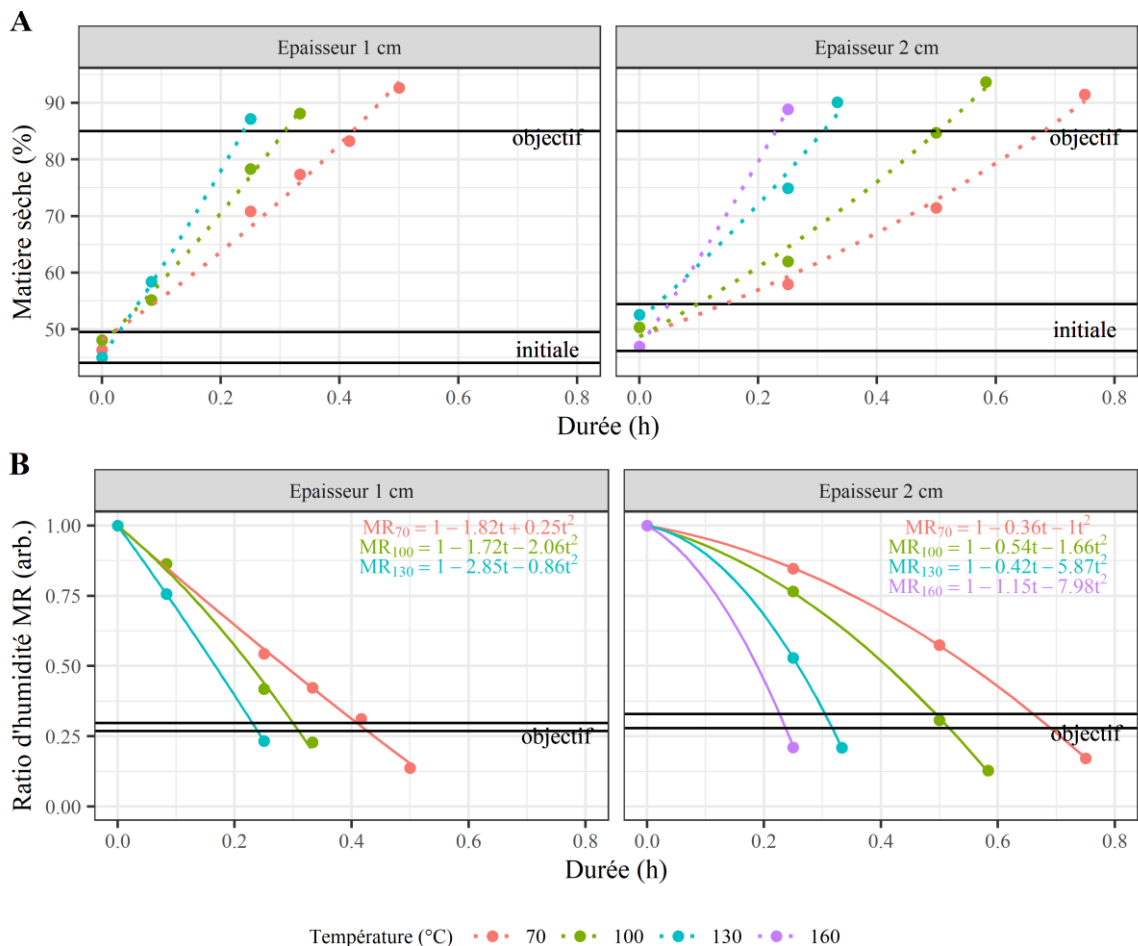


Figure 5.12 : Durée minimale de séchage en sécheur à tapis en continu des co-produits de pressage des graines pour leur conservation longue durée. L'évolution de la teneur en matière sèche des co-produits de pressage des graines séchés entre 70 et 160 °C (A) a permis l'élaboration d'un modèle de cinétique de séchage (B) à partir du ratio d'humidité. Les températures de séchage sont représentées en rouge pour 70 °C, vert pour 100 °C, bleu pour 130 °C et violet pour 160 °C, et réparties entre les épaisseurs de matière sur le tapis de 1 cm (gauche) et 2 cm (droite).

La teneur en matière sèche visée des co-produits de pressage des graines après le procédé est de 85 % et correspond, d'après le taux d'humidité moyen initial, à un ratio d'humidité de 0,27-0,30, et 0,28-0,33 pour une épaisseur de 1 et 2 cm respectivement. Le modèle empirique de Wang and Singh [432] a été utilisé pour déterminer les durées minimales nécessaires pour atteindre le ratio d'humidité ciblé au vu de son adéquation avec les points expérimentaux.

$$MR = 1 + at + bt^2$$

Avec:

*MR*: ratio d'humidité

*a*: constante empirique

*b*: constante empirique

*t*: durée de séchage

Comme attendu, l'augmentation de la température de séchage diminue la durée minimale nécessaire pour atteindre la température ciblée. Pour une épaisseur de co-produits de 2 cm, cette durée est de 0,69, 0,52, 0,32 et 0,24 h soit 41, 31, 19 et 14 min à 70, 100, 130 et 160 °C respectivement. Lorsque l'épaisseur de co-produits est réduite à 1 cm, cette durée diminue d'environ un tiers pour atteindre 26, 19 et 14 min à 70, 100 et 130 °C, respectivement. La réduction de l'épaisseur de la matière dans le sécheur permet d'augmenter la surface d'échange avec l'air sec entrant et de diminuer la résistance de la matrice à l'air, et ainsi favorise la diffusion de la chaleur et de l'eau à travers la matrice. Ces résultats sont prometteurs sur l'intérêt du sécheur en continu pour la valorisation des co-produits de pressage des graines de grenades. La qualité des co-produits doit cependant être maintenue pour valider le procédé.

La composition chimique des co-produits de pressage des graines de grenade séchés en continu est donnée dans le tableau 5.10 et la figure 5.13, par température et épaisseur de matière employées.

Tableau 5.10 : Composition des co-produits de pressage des graines de grenade après séchage en sécheur à tapis en continu, campagne 2021.

Composition	Conditionnement							p cor. (H)
	Epaisseur 1 cm			Epaisseur 2 cm				
	70°C	100°C	130°C	70°C	100°C	130°C	160°C	
Rendement huile (g/g ms)	25 ± 0	24 ± 0	24 ± 0	26 ± 1	26 ± 0	22 ± 1	24 ± 1	<b>0,01</b>
Acide myristique C14:0 (%)	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,69
Acide palmitique C16:0 (%)	2,74 ± 0,02	2,77 ± 0,02	2,73 ± 0,02	2,71 ± 0,02	2,64 ± 0,00	2,74 ± 0,02	2,68 ± 0,00	<b>0,01</b>
A. palmitoléique C16:1n-7 (%)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	
Acide stéarique C18:0 (%)	1,78 ± 0,01	1,76 ± 0,04	1,76 ± 0,00	1,77 ± 0,01	1,78 ± 0,01	1,76 ± 0,01	1,79 ± 0,00	0,72
Acide oléique C18:1n-9 c (%)	4,29 ± 0,01	4,34 ± 0,03	4,29 ± 0,00	4,52 ± 0,00	4,76 ± 0,01	4,94 ± 0,00	4,42 ± 0,02	<b>0,00</b>
Acide linoléique C18:2n-6 c (%)	5,66 ± 0,01	5,80 ± 0,02	5,70 ± 0,03	5,74 ± 0,00	5,94 ± 0,01	6,40 ± 0,00	5,74 ± 0,03	<b>0,00</b>
A. α-linolénique C18:3n-3 c (%)	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	<b>0,00</b>
A. punicique C18:3n-5 c,t,c (%)	83,21 ± 0,16	82,88 ± 0,35	83,23 ± 0,04	83,21 ± 0,07	82,61 ± 0,04	81,51 ± 0,09	83,05 ± 0,12	<b>0,00</b>
A. catalpique C18:3n-5 t,t,c (%)	0,50 ± 0,05	0,52 ± 0,08	0,47 ± 0,04	0,40 ± 0,02	0,46 ± 0,02	0,59 ± 0,02	0,50 ± 0,06	0,38
A. β-éléostéarique C18:3n-5 t,t,t (%)	0,69 ± 0,05	0,72 ± 0,14	0,65 ± 0,05	0,51 ± 0,07	0,62 ± 0,04	0,81 ± 0,04	0,64 ± 0,07	0,38
A. arachidique C20:0 (%)	0,40 ± 0,00	0,41 ± 0,01	0,40 ± 0,00	0,41 ± 0,00	0,41 ± 0,00	0,41 ± 0,00	0,40 ± 0,01	0,72
A. eicosénoïque C20:1n-9 c (%)	0,39 ± 0,00	0,38 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,39 ± 0,00	0,40 ± 0,00	0,40 ± 0,00	0,39 ± 0,00	0,17
A. béhénique C22:0 (%)	0,24 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,24 ± 0,00	0,27 ± 0,00	0,31 ± 0,01	0,27 ± 0,00	<b>0,01</b>
A. lignocérique C24:0 (%)	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,32

Les valeurs sont les moyennes ± écart-type de l'analyse de 2 échantillons. La significativité de la température de séchage est donnée par la p-valeur d'une analyse de la variance en gras ajustée avec la correction de Holm (p cor. (H)). A. : Acide.

La teneur en huile des co-produits de pressage est comprise entre 22 et 26 %, et est affectée significativement par la méthode de séchage ( $p < 0,05$ ). Pour 1 cm d'épaisseur, la température ne semble pas influencer le rendement en huile (24-25 %), alors que pour 2 cm le rendement semble diminuer de 4 % à 130 °C (26 à 22 %) puis augmente de 2 % lorsque la température atteint 160 °C. Les différences entre les deux méthodes de séchage peuvent être expliquées par l'épaisseur de matière dans le sécheur ou le temps de passage. A 130 °C, la durée de passage est de 20 min (0,33 h) pour une épaisseur de 2 cm et de 15 min (0,25 h) pour une épaisseur de 1 cm, et le rendement en huile diminue de 2 %. Pour une épaisseur de 2 cm, passer de 130 °C à 160 °C diminue le temps de passage de 20 à 15 min et la teneur en huile augmente de 2 %. Ces résultats suggèrent qu'à partir de 130 °C, une durée de séchage supérieure à 15 min entraîne une diminution du rendement en huile. Taha et Matthäus [433] ont aussi observé des variations non linéaires de la teneur en huile des graines de carthame en fonction de la température de traitement variant de 120 à 180 °C, et de l'origine des graines. De même, la torréfaction à 130 °C des noisettes entraîne un rendement en

huile plus faible qu'à 150 °C, qui décroît ensuite jusqu'à 210 °C [434]. Une hypothèse pourrait expliquer la différence de rendement entre 130 et 160 °C est la dégradation de structures cellulaires ou composés piégeant les lipides à partir de 160 °C, entrant en compétition avec les phénomènes d'altération des lipides et menant à une hausse du rendement en huile. En effet, il a été montré que l'augmentation de la durée et de la température de prétraitement d'amandes n'affecte pas significativement le profil d'acides gras de l'huile, mais influence les teneurs en autres lipides de l'huile [435]. A 125 °C, la teneur en phospholipides est plus faible qu'à 150 et 175 °C selon la durée du traitement, alors que les teneurs en tocophérols diminuent ou restent stables.

Le profil d'acides gras des co-produits séchés est dominé par l'acide punicique (C18:3n-5,etc) avec des teneurs comprises entre 81,5 et 83,2 % des acides gras identifiés. Dans l'ordre décroissant de leurs teneurs, les acides linoléique (C18:2n-6), oléique (C18:1n-9), palmitique (C16:0) et stéarique (C18:0) sont retrouvés respectivement à hauteur de 5,7-6,4, 4,3-4,9, 2,6-2,8, et 1,8 %. Les autres acides gras représentent moins de 1 % des acides gras totaux.

Les paramètres du sécheur à tapis affectent significativement ( $p < 0,05$ ) la moitié des teneurs en acides gras identifiés. Parmi les acides gras saturés affectés par le mode de séchage, les variations des teneurs en acide palmitique (C16:0) béhénique (C22:0) sont significatives mais inférieures à 1 %, donc négligeables. Les autres acides gras affectés par le séchage sont les acides gras mono ou poly-insaturés. La teneur relative en acide oléique (C18:1n-9) diminue lors du séchage à 160 °C et à 2 cm d'épaisseur, pour une variation totale inférieure à 1 %. Les teneurs en acides linoléique (C18:2n-6) et  $\alpha$ -linoléique fluctuent au cours du séchage aux différentes températures pour les deux épaisseurs, pour une variation totale aussi inférieure à 1 %. Finalement, la teneur en acide punicique n'est pas influencée par la température à 1 cm, mais semble diminuer de moins de 2 % avec l'augmentation de la température à 130 °C pour une épaisseur de 2 cm.

Les variations totales des teneurs relatives en acides gras sont très faibles (<2 %) après le séchage en sécheur à tapis aux différentes épaisseurs et températures. Comme pour l'évolution du rendement en huile, la température de 130 °C semble être à l'origine des modifications les plus importantes du profil d'acides gras des co-produits, alors que les co-produits séchés à 160 °C ont une composition sensiblement similaire aux co-produits séchés à 70 et 100 °C. La diminution de l'acide punicique au profit des acides gras à degré d'insaturation plus bas suggère que l'acide punicique pourrait s'oxyder ou se dégrader avec les paramètres de séchage 130 °C et 20 min, et rester stable dans les autres conditions. Cette dégradation est inférieure à 2 % et paraît globalement négligeable, contrairement à la teneur en huile réduite de 4 à 5 % après 20 min à 130 °C. Dans l'ensemble, le profil d'acides gras des co-produits de pressage séchés au sécheur à tapis est similaire à celui des autres méthodes de séchage.

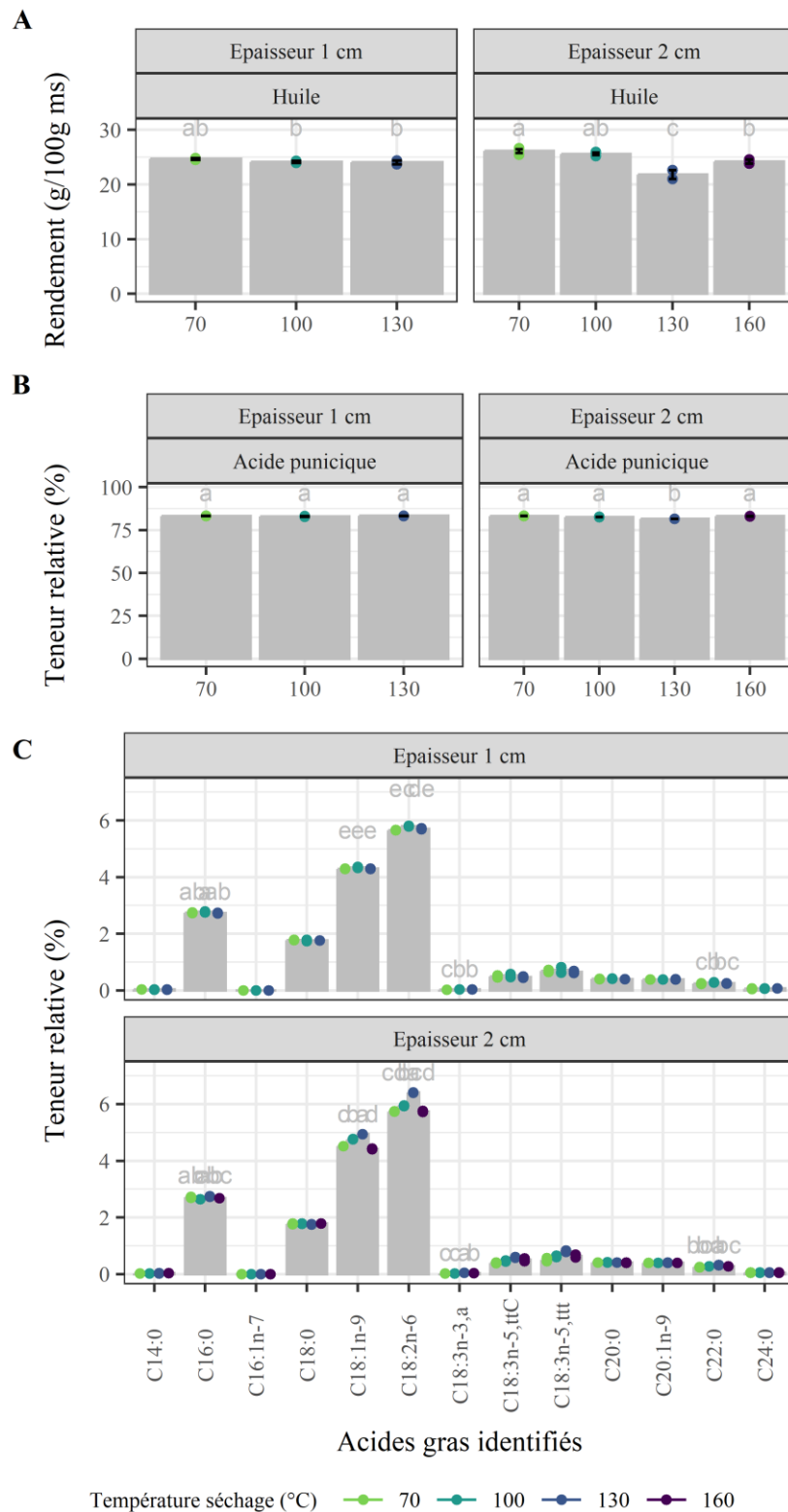


Figure 5.13 : Évolution des teneurs en huile (A) et acides gras (B,C) des co-produits de pressage des graines de grenade après séchage en sécheur à tapis en continu, campagne 2021. Le rendement en huile et les teneurs en acides gras moyennes sont représentées par les barres grises par épaisseur de matière sur le tapis (1 et 2 cm) et les points correspondant aux températures de séchage de 70 °C en vert, 100°C en bleu clair, 130°C en bleu foncé et 160°C en violet.

Les résultats précédents semblent indiquer que le sécheur à tapis serait une alternative viable à l'étuve ventilée. Le type d'appareil de séchage, étuve ventilée ou sécheur à tapis, a donc été comparé à une température identique de 70 °C, et les résultats sont présentés dans le tableau 5.11.

Tableau 5.11 : Effet du type d'appareil utilisé et des paramètres de séchage sur la composition en lipides des co-produits de pressage des graines (campagne 2021).

<b>Paramètres séchage</b>			
Type	continu	continu	etuve
Epaisseur (cm)	1	2	3
Température (°C)	70	70	70
Durée (h)	0,5	0,75	22,083
<b>Composition</b>			
Rendement huile (g/100g ms)	25 ± 0	26 ± 1	19 ± 0
Acide myristique C14:0 (%)	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00
Acide palmitique C16:0 (%)	2,74 ± 0,02	2,71 ± 0,02	2,77 ± 0,00
Acide palmitoléique C16:1n-7 (%)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Acide stéarique C18:0 (%)	1,78 ± 0,01	1,77 ± 0,01	1,84 ± 0,01
Acide oléique C18:1n-9 c (%)	4,29 ± 0,01	4,52 ± 0,00	4,79 ± 0,01
Acide linoléique C18:2n-6 c (%)	5,66 ± 0,01	5,74 ± 0,00	5,86 ± 0,02
Acide α-linolénique C18:3n-3 c (%)	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00
Acide punicique C18:3n-5 c,t,c (%)	83,21 ± 0,16	83,21 ± 0,07	82,43 ± 0,01
Acide catalpique C18:3n-5 t,t,c (%)	0,50 ± 0,05	0,40 ± 0,02	0,53 ± 0,00
Acide β-élostéarique C18:3n-5 t,t,t (%)	0,69 ± 0,05	0,51 ± 0,07	0,58 ± 0,01
Acide arachidique C20:0 (%)	0,40 ± 0,00	0,41 ± 0,00	0,42 ± 0,00
Acide eicosénoïque C20:1n-9 c (%)	0,39 ± 0,00	0,39 ± 0,00	0,42 ± 0,00
Acide béhénique C22:0 (%)	0,24 ± 0,01	0,24 ± 0,00	0,23 ± 0,02
Acide lignocérique C24:0 (%)	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,07 ± 0,00

Les valeurs sont les moyennes ± écart-type de l'analyse de 2 échantillons.

Le rendement en huile obtenu après séchage en étuve ventilée (19 %) est plus faible qu'avec le sécheur en continu (25-26 %), avec une diminution de 6,5 % en moyenne. L'épaisseur de matière ne semble pas influencer le rendement en huile car des valeurs similaires sont retrouvées pour les deux lots de co-produits séchés en continu à 1 et 2 cm. La durée d'exposition à la chaleur est 30 fois plus élevée lors du séchage en étuve ventilée, et ce paramètre pourrait expliquer un rendement plus faible. Une diminution du rendement en huile avec l'augmentation de la température de séchage de graines de papaye a aussi été montré par Chielle et al. [436]. Plus spécifiquement, l'effet de la température, la durée et la vitesse de l'air sur le rendement en huile des graines a été modélisé par surface de réponse. Selon la température considérée (40-100 °C), l'augmentation de la durée de séchage a un effet bénéfique ou délétère sur le rendement en huile. Entre 40 et 70 °C, plus la durée de séchage est longue, plus le rendement est élevé, alors qu'entre 90 et 100 °C une durée plus longue entraîne un rendement plus faible. Cette étude montre donc que la durée de séchage peut avoir des effets antagonistes sur l'huile extraite selon la température considérée. Dans le cas des co-produits de pressage des graines, il semble que l'augmentation de la durée de séchage de 0,5-0,75 à 22 heures à 70 °C ait un effet délétère sur le rendement en huile extraite.



Le profil d'acides gras est sensiblement similaire entre les trois méthodes de séchage, avec une légère diminution de moins de 1 % d'acide punicoïque observée en étuve ventilée, combinée à une augmentation de moins de 1 % des acides gras à 18 carbones moins insaturés. Ces variations pourraient être issues d'une oxydation ou dégradation de l'acide gras majoritaire, l'acide punicoïque. Néanmoins les fluctuations sont minimales avec moins de 1 % d'écart entre les trois méthodes de conditionnement : les profils d'acides gras peuvent donc être considérés comme semblables.

De la même manière la comparaison du séchage des co-produits de pressage des graines en étuve ventilée à 150 °C et avec le sécheur en continu à 160 °C montre que le rendement en huile est plus élevé, 18 et 24 % respectivement, pour des durées de 2,9 h et 0,25 h. La teneur relative en acide punicoïque augmente de 2 % (de 81 à 83 %) lorsque la durée de séchage diminue, alors que la teneur des autres acides gras varie de moins de 1 %. Les deux méthodes entraînent donc un profil en acides gras similaires, mais un rendement en huile plus élevé est observé dans le sécheur en continu.

Le sécheur à tapis, par comparaison avec l'étuve ventilée, semble être une méthode efficace pour déshydrater les co-produits de pressage des graines de grenade sans altérer leur composition en lipide.

## 5.4. Conclusion

Les travaux de ce chapitre ont montré que les deux méthodes de conditionnement (déshydratation, ensilage) étudiées pendant ces travaux ont des effets variables sur les co-produits de grenade.

**Au cours de l'ensilage**, le rendement en extractibles au méthanol des péricarpes de grenade diminue, de même que les teneurs en polyphénols totaux et punicalagine, au profit de la punicaline et de l'acide ellagique. Ces variations sont expliquées par les changements générés par les micro-organismes dans les péricarpes, qui entraînent potentiellement l'hydrolyse des ellagitannins et l'oxydation des polyphénols. Ce procédé a un effet inverse sur le rendement en huile des co-produits de pressage des graines, qui est multiplié par deux après 8 semaines d'ensilage. Le profil d'acides gras des co-produits évolue aussi au cours de l'ensilage, et la teneur en acide punicoïque, acide gras majoritaire, diminue au profit d'autres acides gras à plus bas degré d'insaturation tout en représentant toujours plus de 75 % des acides gras.

L'huile des co-produits de pressage des graines semble mieux extraite après fermentation anaérobie, sans que cela n'affecte le profil d'acides gras. En considérant que l'huile extraite est composée intégralement des acides gras identifiés, la teneur en acide punicoïque peut être estimée à 8,1 % après lyophilisation (10 % d'huile, 81 % d'acide punicoïque), et 14 % après 8 semaines d'ensilage et lyophilisation (19 % d'huile, 76 % d'acide punicoïque). La fermentation des co-produits en tant que prétraitement avant extraction pourrait donc augmenter les quantités d'acide punicoïque extraites.

**Le séchage** des péricarpes de grenade par étuve ventilée à 40 et 70 °C diminue le rendement en extractibles au méthanol de même que les teneurs en polyphénols totaux et en punicalagine par comparaison avec la lyophilisation. Les polyphénols totaux

représentant 43 à 55 % des extractibles (tableau 5.5), les composés contenus dans la fraction complémentaire peuvent aussi être impactés. La teneur en punicaline est particulièrement élevée après le séchage à 70 °C, et cela suggère que la punicalagine serait transformée en punicaline au cours du procédé. La composition des co-produits de pressage des graines évolue peu entre les trois conditionnements, avec un rendement en huile compris entre 10 et 11 % et une diminution de moins de 2 % de l'acide punicique avec l'augmentation de la température, toujours prédominant dans les co-produits à hauteur de 78 % minimum. Les résultats des premiers essais de déshydratation des co-produits de pressage ont été validés lors d'une seconde campagne, dans laquelle l'augmentation de la température de séchage à 150 °C n'a montré que peu d'influence sur la composition lipidique des co-produits.

La durée de séchage des co-produits de pressage des graines a été réduite drastiquement avec l'emploi d'un sécheur en continu : de 3-16 h en étuve entre 40 et 150 °C à 14-41 min en sécheur continu entre 70 et 160 °C et 1-2 cm d'épaisseur. Cette diminution est accompagnée d'une amélioration du rendement en huile et un profil d'acides gras stable. L'acide punicique est toujours majoritaire et augmente de 2 % entre l'étuve ventilée et le sécheur à tapis, au détriment des acides gras moins insaturés, ce qui suggère que les durées longues en étuve ventilée favorisent l'oxydation des acides gras. Ces essais ont aussi montré que l'augmentation de la température de séchage pour diminuer la durée aurait une limite, et que les composés présents dans les co-produits pourraient se dégrader lors d'une exposition prolongée à haute température, comme montré avec une diminution de 2-4 % du rendement en huile après 20 min à 130 °C. Sachant que des études ont montré que l'exposition à de hautes températures de graines oléagineuses ou d'huile végétale peut générer des composés potentiellement toxiques [437] ou diminuant les propriétés organoleptiques des huiles [438] sans altérer les profils d'acides gras, des études de toxicité et de qualité de l'huile seront à conduire si la déshydratation à haute température est sélectionnée pour stabiliser les co-produits, dans le cadre de leur valorisation.

Des températures élevées sur de courtes durées ne modifient donc pas sensiblement la composition des co-produits de pressage des graines de grenade. Par sécurité au vu des effets potentiellement négatifs d'une exposition longue à haute température, les co-produits pourraient être séchés en 15 minutes à 100 °C à une épaisseur inférieure à 1 cm avec un sécheur industriel à tapis.

Les éléments principaux à considérer pour le conditionnement des péricarpes de grenade sont leur sensibilité à la fermentation et par conséquent la nécessité de les traiter rapidement après leur génération. Les péricarpes peuvent être conditionnés en étuve ventilée à 40 °C, bien qu'un procédé à plus faible température et durée d'exposition serait plus intéressant. Différents procédés ont été développés dans ce but comme le séchage sous vide ou dans un sécheur rotatif. Par exemple, Galaz et al. [195] ont séché les péricarpes de grenade avec un sécheur à tambour de 100 à 120 °C en moins de 7 minutes, et sans modifier leur teneur en polyphénols totaux. Dans le cas particulier de la production d'acide ellagique pour les industries, la fermentation anaérobie des péricarpes pourrait être une piste à explorer, étant donné les teneurs élevées en acide ellagique produites. De nouveaux essais de fermentation plus longs pourraient être envisagés pour augmenter encore la teneur en acide ellagique.



## CONCLUSION GENERALE

---

Dans le cadre des enjeux de maintien et d'amélioration de la biodiversité et face à un besoin de diversification de l'arboriculture en Occitanie, la filière s'est orientée vers le grenadier facile à entretenir et dont la récolte est décalée dans le temps par rapport aux autres cultures. C'est dans un contexte de développement de l'économie circulaire que les acteurs de cette culture émergente en France ont entrepris une réflexion sur les voies de valorisation alternatives et complémentaires des co-produits du fruit du grenadier, la grenade. Les travaux décrits dans ce manuscrit s'inscrivent dans un vaste programme d'étude collaboratif financé par les Fonds Européens à l'initiative de la Région Occitanie (projet GIMMS) ayant pour objectif de décrire et de proposer de nouvelles voies de valorisation des co-produits de la grenade française incluant la construction de *scenarii* économiques et marketing pour la grenade occitane. C'est dans ce cadre que des travaux ont été menés sur les fractions d'intérêt à valeur ajoutée issues des co-produits de grenade et que les impacts des conditions de culture des grenades, de la conservation des fruits ainsi que du conditionnement des co-produits ont été recherchés notamment sur les composés phénoliques et lipidiques des co-produits de transformation des grenades. Les travaux réalisés pour répondre à ces questions se sont articulés en trois chapitres (chapitres 3, 4 et 5).

**L'étude des conditions de culture** des grenades (chapitre 3) a été conduite à l'aide de deux variétés de grenades, Mollar de Elche et Provence cultivées sur 6 et 5 parcelles, respectivement, et traitées ou non par pulvérisation foliaire de nutriments visant la diminution de l'éclatement des fruits.

Ce chapitre a mis en évidence des différences entre les deux variétés, résidant principalement dans les teneurs en polyphénols des péricarpes, et des similitudes, concernant notamment le profil d'acides gras des co-produits de pressage des graines. Les péricarpes de la variété Provence contiendraient environ 30 % de polyphénols totaux et 20 % de punicalagine en plus de ceux de la variété Mollar de Elche, avec des teneurs de 280 mg eag/g ms et 128 mg/g ms, respectivement. Par ailleurs, dans les deux variétés la punicalagine est l'ellagitannin prédominant devant l'acide ellagique et la punicaline qui sont retrouvés à hauteur de 3-4 et 1-2 mg/g ms, respectivement, dans les péricarpes des deux variétés. Les co-produits de pressage des deux variétés contiennent environ 20 % d'huile, et le profil en acides gras est dominé par l'acide punicoïque à plus de 82 % des acides gras totaux.

La localisation des parcelles semble avoir une influence importante sur les teneurs en polyphénols, faible sur le profil lipidique des co-produits, et négligeable sur le rendement en huile, qui dépend de la variété considérée. Les péricarpes de Provence contiennent de 192 à 330 mg eag/g ms de polyphénols totaux et de 73 à 164 mg/g ms de punicalagine selon la parcelle, et ceux de Mollar de Elche de 148 à 260 mg eag/g ms de polyphénols totaux et de 80 à 147 mg/g ms de punicalagine. Les variations des teneurs en acides gras identifiés dans les co-produits de pressage touchent principalement l'acide punicoïque dont les teneurs sont de 80,7 à 83,5 % pour Mollar de Elche, et de 80,3 à 83,7 % pour Provence. Les conditions pédoclimatiques de culture des grenades sembleraient donc faire varier en moyenne de 30 % les teneurs

en polyphénols totaux et punicalagine, et de 1-2 % les teneurs en acide punicoïque des co-produits de pressage des graines.

Le traitement foliaire des grenadiers affecte la composition des co-produits de manière homogène entre les deux variétés. En effet, les polyphénols principaux des péricarpes semblent s'être accumulés dans les deux variétés, de 244 à 281 mg eag/g ms pour les polyphénols totaux et de 118 à 142 mg/g ms pour la punicalagine, soit des augmentations de 15 et 20 %, alors que la teneur relative en acide punicoïque diminue de 0,4 % en moyenne pour la variété Provence, et celle en acide  $\beta$ -éléostéarique, son isomère, diminue de moins de 0,1 % pour la variété Mollar de Elche.

**L'étude des conditions de conservation** des grenades (chapitre 4) a été effectuée avec les grenades des variétés Mollar de Elche et Valenciana dont les caractéristiques qualitatives ont été suivies au cours de leur conservation pendant deux mois en plus de la composition de leurs co-produits. Douze conditions de conservation ont été mises en œuvre dans le but d'évaluer les effets de l'humidité et de la température de conservation, ainsi que d'un traitement par immersion des grenades avant leur conservation.

Au regard de leur état initial, la masse des grenades des deux variétés diminue en moyenne de 16 % après 8 semaines de conservation, et de manière plus importante lorsque l'humidité environnante est faible, en moyenne de 37 %. Pour la variété Valenciana, les immersions dans de l'eau à 55 °C ou une solution de bicarbonate de sodium ou bien d'*Aloe vera* à 20 °C semblent réduire cette perte de masse de 5 % comparée au témoin non traité ; la conservation à 4 °C diminue cette perte de masse de 7-9 % comparé au témoin conservé à 17 °C.

La couleur des grenades évolue négativement au cours de la conservation, en moyenne de 12 unités arbitraires après 8 semaines de conservation. Cette évolution semble indépendante de la méthode de conservation pour la variété Mollar de Elche alors qu'elle semble plus faible pour les grenades Valenciana conservées à 4 °C, avec une diminution moyenne de 6 unités arbitraires.

Les altérations de surface semblent affecter principalement la variété Valenciana, dont les taux d'altérations d'origines physiologique ou microbienne, de craquement, et d'éclatement sont en moyenne de 23, 13 et 10 % après 8 semaines de conservation, soit 10 % plus élevés que pour la variété Mollar de Elche. La proportion de grenades Valenciana altérées semble limitée par la conservation à 4 °C et une humidité relative plus faible.

La conservation de ces grenades semble affecter principalement les polyphénols des péricarpes, dont les teneurs varient de -0,3 à -33 mg, jusqu'à +4,7 et +18 mg par gramme de péricarpe, par rapport aux teneurs initiales, alors que les teneurs relatives en acides gras des co-produits de pressage des graines varient de moins de 2 % et que le profil en acides gras reste dominé par l'acide punicoïque à hauteur de 81 à 83 %. Les variations du rendement en huile engendrées par la conservation, de 11 à 20 %, ne sont pas expliquées par les paramètres étudiés, et par conséquent une étude complémentaire paraît nécessaire pour comprendre ces variations.

Les teneurs en polyphénols totaux et en punicalagine sont celles qui évoluent le plus en termes de quantités présentes dans les péricarpes (de -33 à +11 mg eag/g ms

et de -8 à +18 mg/g ms, en moyenne pour les deux variétés), et la punicalagine reste l'ellagitannin majoritaire (47 - 73 mg/g ms) au cours de la conservation devant la punicaline (0,6 - 5,6 mg/g ms) et l'acide ellagique (2,9 - 9,1 mg/g ms). Néanmoins, les teneurs de ces deux polyphénols sont celles dont les proportions augmentent le plus au cours de la conservation, puisqu'elles peuvent être multipliées par 2 à 5 selon la méthode de conservation. Ces variations sont complexes puisqu'elles semblent dépendantes de la molécule, la variété, la durée et la condition de conservation. Pour Valenciana, les conclusions sur les effets des paramètres étudiés et notamment celui de la température semblent difficiles à déterminer et cela pourrait être dû aux fortes altérations des fruits.

La qualité des grenades et de leurs co-produits semble préservée par la conservation après une acclimatation à 15 °C pendant 10 jours, à une humidité relative supérieure à 92 % et dans un environnement avec circulation d'air. L'immersion des grenades dans une solution de bicarbonate de sodium à 55 °C pourrait permettre de maximiser leurs caractéristiques qualitatives et les teneurs en polyphénols totaux des péricarpes sans affecter la composition lipidique des co-produits de pressage. Parmi les températures de conservation évaluées, une température de 4 °C semble être adéquate pour Mollar de Elche mais l'effet d'une température intermédiaire entre 4 et 17 °C à haute humidité relative devrait être étudié, notamment pour la variété Valenciana.

**L'étude du conditionnement des co-produits** (chapitre 5) issus de la transformation d'un mélange de variétés de grenades a mis en jeu deux méthodes, l'ensilage et le séchage, sélectionnées pour leur compatibilité avec les infrastructures existantes de la filière grenade d'Occitanie.

L'ensilage implique une fermentation spontanée de la matière qui semble affecter les compositions phénolique et lipidique des co-produits de grenade. La teneur en polyphénols totaux des péricarpes diminue au cours du procédé et ce jusqu'à 30 % en moins par rapport à la matière non fermentée. La teneur en punicalagine diminue encore plus drastiquement (de 115 à 13 mg/g ms) jusqu'à presque 90 % et semblerait coïncider avec une augmentation des teneurs en punicaline (de 2,2 à 77 mg/g ms) et en acide ellagique (de 2,9 à 24,8 mg/g ms) pouvant indiquer une hydrolyse de la première. Le rendement en huile des co-produits de pressage est augmenté de 8 à 9 % après 6 à 8 semaines de fermentation spontanée, et le profil en acides gras semble peu affecté, avec une prédominance de l'acide punicoïque. La teneur relative de ce dernier est celle qui évolue le plus au cours de l'ensilage avec une diminution de 80,7 à 76,5 % de la première à la huitième semaine de fermentation.

La température et le mode de séchage des co-produits de grenade affectent principalement leur composition en polyphénols. Jusqu'à 25 % des polyphénols totaux et punicalagine des péricarpes sont détériorés par le séchage en étuve ventilée à 70 °C alors qu'à 40 °C leurs teneurs sont maintenues autour de 210-220 mg/g ms et 100-120 mg/g ms, respectivement, par rapport à la lyophilisation. La composition des co-produits de pressage des graines reste globalement inchangée par ces trois modes de séchage, avec une teneur en huile de 10-11 g/100g ms et un profil d'acides gras dominé par l'acide punicoïque à hauteur de 78 à 81 %. La diminution de la durée de séchage de 14-16 h à 2,7-2,9 h *via* l'augmentation de la température de 40 à 150 °C en étuve ventilée est possible sans affecter fortement leur composition lipidique. Cette durée peut être encore diminuée de 2,7-2,9 h à 150 °C à 14 minutes à 160 °C dans un

séchoir à tapis avec une amélioration du rendement d'extraction de l'huile de 5 % et de la teneur en acide punicique de 2 %, potentiellement liée au temps de passage court à haute température. Au vu de la gamme de température du séchoir à tapis (à partir de 70 °C) correspondant à celle conduisant à la détérioration des polyphénols en étuve ventilée, les péricarpes de grenade n'ont pas été totalement déshydratés par cette méthode. Cependant, les résultats concernant le maintien de la composition des co-produits de pressage des graines encouragent des essais dans ce sens.

Ces trois études ont mis en évidence une sensibilité plus importante des polyphénols des péricarpes que des lipides des co-produits de pressage des graines aux procédés de culture et de conservation des grenades ainsi qu'au conditionnement des co-produits. Les polyphénols des péricarpes des grenades françaises sont principalement constitués de punicalagine, dont la teneur diminue le plus fortement de 90 % après la fermentation spontanée de la matière, mais varie aussi avec les conditions de culture, de conservation, et de conditionnement par déshydratation. Le profil en acides gras des co-produits de pressage des graines est dominé par l'acide punicique, dont la teneur relative est la plus affectée par l'ensilage, avec une diminution maximale de près de 5 %, alors que des augmentations et diminutions de moins de 2 % sont retrouvées dans les co-produits après conservation des grenades ou séchage. Un récapitulatif général des compositions en polyphénols et en lipides des co-produits de grenades est donné dans le tableau **6.1**.

La variété de grenade semble avoir une importance majeure sur la composition en polyphénols des péricarpes, et ceux de la variété Provence semblent contenir des teneurs en polyphénols plus élevées que les autres variétés. Les variations du rendement en huile et de la teneur en acide punicique liées à la variété paraissent minimes. Les conditions pédoclimatiques et de conservation des grenades impactent à la fois les polyphénols des péricarpes et les lipides des co-produits de pressage, cependant l'origine des variations reste encore à déterminer. Des études complémentaires incluant, par exemple, l'irrigation des parcelles ou des gammes de température et d'humidité relative plus étoffées permettraient de compléter ces travaux. Le conditionnement des co-produits par ensilage a aussi un impact très important sur la composition des co-produits de grenades, délétère pour les polyphénols des péricarpes excepté pour l'acide ellagique, et bénéfique pour le rendement en huile. La déshydratation des péricarpes doit être effectuée dans des conditions de température modérée sous peine de détériorer les polyphénols des péricarpes, alors que des températures élevées n'influencent pas notablement les lipides des co-produits de pressage.

Tableau 6.1 : Récapitulatif de la variation des principaux composants des co-produits de transformation des grenades.













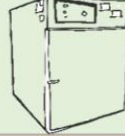
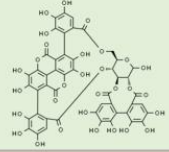


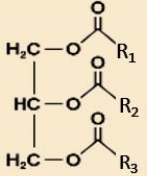




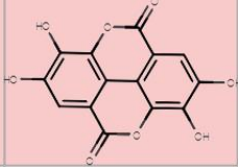
<b>Paramètres étudiés</b>												
Variété	Provence	Mollar de Elche			Valenciana			Mélange Wonderful, Mollar de Elche, Provence et Acco			Mélange Wonderful, Mollar de Elche et Provence	
Origine (nombre de parcelles)	5	7	1		1			Multiples parcelles			Multiples parcelles	
Durée conservation (semaine)	0	0	4	8	0	4	8	0			0	
Durée ensilage (semaine)	0	0			0			0	1 à 8 semaines		0	
Méthode séchage	L	L			L			L ou EV (40°C)	EV (70°C)	L	EV (40 - 150°C)	ST (70 - 160°C)
<b>Chapitres</b>												
	3	3 et 4	4		4			5			5	
<b>Péricarpe</b>												
Teneur en polyphénols totaux (mg eag/g ms)	192-363	148-260	116-189	134-180	130	74-143	77-136	213-215	161	155-216		
Teneur en punicalagine (mg/g ms)	73-164	67-147	51-88	57-87	43	27-69	19-85	102-115	85	13-115		
Teneur en punicaline (mg/g ms)	1,1-1,2	0,8-3,3	0,6-1,1	0,7-1,5	1,0	0,4-3,4	0,6-9,8	1,9-2,2	2,6	2,2-77,4		
Teneur en acide ellagique (mg/g ms)	2,7-3,7	2,7-5,0	2,3-3,7	2,4-4,1	5,3	3,0-7,5	3,4-14,1	2,7-2,9	2,6	2,9-24,8		
<b>Co-produit de pressage</b>												
Rendement en huile (g/100 g)	13-22	11-23	12-19	12-20	19	13-15	12-16	10-11	11	10-19	18-21	22-26
Teneur relative en acide punicique (% des acides gras totaux)	80,3-83,7	80,7-83,5	81,3-83,1	80,5-83,5	82,8	80,6-83,4	80,9-83,2	79,0-80,7	81,9	76,5-80,7	81,0-82,6	81,5-83,2

L : lyophilisation, EV : étuve ventilée, ST : sécheur industriel à tapis.



D'après tous ces éléments, les procédés conduisant à une accumulation des composés à valeur ajoutée des co-produits de grenade tout en limitant la détérioration des grenades peuvent être choisis en fonction des molécules ciblées (figure 6.1).

- (i) Si les teneurs en polyphénols totaux et en punicalagine des péricarpes sont privilégiées, les procédés de culture et de conservation des grenades optimaux correspondent aussi à ceux conduisant à une teneur en huile élevée dans les co-produits de pressage des graines. Cette huile contiendrait par ailleurs une teneur en acide punicique supérieure à 75 %. Néanmoins, les méthodes de conditionnement des deux types de co-produits sont différentes.
- (ii) En revanche, si l'objectif est l'obtention d'une proportion élevée d'acide punicique dans l'huile des co-produits de pressage des graines, une seconde voie est proposée, mettant en jeu des procédés différents de la culture des grenadiers à la stabilisation des co-produits de transformation.
- (iii) Une troisième voie peut aussi être mise en place pour obtenir une teneur élevée en acide ellagique dans les péricarpes. L'augmentation de cette teneur au cours de la conservation est liée à des teneurs en polyphénols, dont la punicalagine, plus faibles et à un changement de couleur plus important. Par conséquent, les procédés de conservation décrits ne conduisent pas au maintien de la qualité des grenades. Ces procédés de conservation sont aussi ceux pour lesquels les taux d'altérations à la surface des grenades sont les plus importants.

	Variété 	Localisation 	Traitement 	Immersion 	Conservation 	Transformation	Ensilage	Séchage	Objectif	Applications potentielles
<b>VOIE 1</b>	•Provence	•Be •Co	•Bore et zinc	•NaHCO <sub>3</sub> 55°C	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Acclimatation</li> <li>•4 ou 17°C *</li> <li>•&gt;92% RH</li> <li>•Durée minimale</li> </ul>		6-8 semaines 	Séchoir à tapis (100°C) 	<b>Huile</b> 	<b>Alimentation humaine &amp; animale</b>  <b>Compléments alimentaires</b> 
							0 semaine	Etuve ventilée (40°C) 	<b>Polyphénols totaux Punicalagine</b> 	
<b>VOIE 2</b>	•Mollar de Elche •Valenciana •Provence •Mélange	•Co *	•Aucun	•Eau 20°C •NaHCO <sub>3</sub> 55°C	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Acclimatation *</li> <li>•4°C *</li> <li>•&gt;92% RH *</li> <li>•Durée minimale</li> </ul>		0 semaine	Séchoir à tapis (100°C) 	<b>Acide punicique</b> 	<b>Cosmétique</b> 
<b>VOIE 3</b>	•Valenciana	•Co *	•Aucun		<ul style="list-style-type: none"> <li>•17°C</li> <li>•&gt;92% RH</li> <li>•Durée maximale</li> </ul>		4-6 semaines 	Etuve ventilée (40°C) 	<b>Acide ellagique</b> 	<b>Thérapeutique</b> <b>Additifs biosourcés</b>

\* À vérifier pour certaines variétés

Figure 6.1 : Proposition de voies de valorisations liées aux conditions d'accumulation de composés à valeur ajoutée dans les co-produits stabilisés de grenades. Mélange : variétés Wonderful, Mollar de Elche et Provence ; RH : Humidité relative.

Ces trois voies de gestion des grenades et de leurs co-produits de transformation pourraient encore être améliorées par l'approfondissement de l'étude des conditions pédoclimatiques, en particulier des facteurs non contrôlés (précipitations, irrigation, analyse des sols), et des conditions de conservation des grenades (température entre 4 et 17 °C, humidité relative entre 63 et 103 %), qui pourraient être à l'origine des variations de composition moléculaire observées. De telles études pourraient permettre de compléter et prédire les changements moléculaires des co-produits de grenade selon les procédés mis en œuvre du verger à la transformation des grenades. Par ailleurs, l'implémentation de ces voies dans la filière grenade du sud de la France permettrait d'obtenir des co-produits stabilisés, contenant un maximum de lipides ou de polyphénols d'intérêts, tout en conservant la qualité des grenades pour les deux premières. L'évaluation des effets de la culture du grenadier à la conservation des grenades sur les qualités gustatives du jus de grenade est cependant nécessaire afin de s'assurer de leur maintien au cours de ces procédés.

Les co-produits de grenade stabilisés pourraient être employés directement dans l'alimentation animale, ou après leur encapsulation dans les filières de l'agroalimentaire en tant que complément alimentaire, avec les limites et les bénéfices décrits dans le chapitre 1. Les procédés supplémentaires d'extraction de l'huile et des polyphénols seraient toutefois à développer ou améliorer pour obtenir des extraits ou de l'huile à destination des mêmes filières. Une purification additionnelle pourrait permettre d'obtenir directement l'acide ellagique des péricarpes ou l'acide punicoïque des co-produits de pressage des graines. Ces composés sont ceux pour lesquels les recherches sont actuellement les plus concluantes, notamment dans le secteur cosmétique pour lequel les ingrédients d'origine naturelle ont une grande importance.

## ANNEXE

---

### Travaux préliminaires

Les résultats concernant la validation des méthodes analytiques données dans le chapitre 2 sont détaillées ci-dessous, par méthode.

- **Teneur en polyphénols totaux**

La teneur en polyphénols totaux a été évaluée par dosage colorimétrique de Folin-Ciocalteu avec l'acide gallique comme étalon externe. La courbe d'étalonnage a été tracée avec la concentration d'acide gallique en fonction de l'absorbance mesurée, corrigée avec la valeur d'absorbance du témoin. La pente  $a$ , l'ordonnée à l'origine  $b$  et le coefficient de corrélation  $R^2$  de la droite entre la concentration et l'absorbance mesurée sont en moyenne de  $61,935 \pm 3,964$ ,  $0,004 \pm 0,004$  et  $0,998 \pm 0,001$  sur 90 étalonnages effectués.

Le tableau **A1** suivant rassemble les valeurs de l'équation de la droite d'étalonnage  $a$ ,  $b$ , ainsi que le coefficient de corrélation  $R^2$  entre la concentration et l'absorbance. Sur 90 étalonnages, les valeurs  $a$ ,  $b$ ,  $R^2$  sont en moyenne de  $61,935 \pm 3,964$ ,  $0,004 \pm 0,004$  et  $0,998 \pm 0,001$ .

Tableau A1 : Etalonnages pour le dosage colorimétrique de Folin-Ciocalteu.

Pente a	Ordonnée à l'origine b	Coefficient de corrélation R <sup>2</sup>	Pente a	Ordonnée à l'origine b	Coefficient de corrélation R <sup>2</sup>	Pente a	Ordonnée à l'origine b	Coefficient de corrélation R <sup>2</sup>
57,845	0,003	0,999	66,528	0,005	0,999	60,288	-0,003	0,999
59,126	0,007	0,999	67,849	0,004	0,999	59,845	0,000	0,999
60,827	0,006	0,998	58,063	0,006	0,999	59,402	0,004	0,999
63,232	0,005	0,998	60,074	0,001	0,998	57,867	0,003	0,999
59,236	0,004	0,998	60,808	0,000	0,998	60,056	-0,001	0,997
60,017	0,004	0,998	60,838	-0,000	0,997	61,369	-0,004	0,999
62,397	0,004	0,998	60,197	0,003	0,998	61,763	-0,005	0,999
60,311	0,007	0,998	58,902	0,004	0,998	62,156	-0,005	0,999
62,798	0,006	0,998	60,688	0,003	0,998	60,011	-0,001	0,999
59,758	0,007	0,998	57,882	0,007	0,998	67,272	0,006	0,999
57,661	0,007	0,997	60,669	0,002	0,998	67,088	0,006	0,999
58,509	0,006	0,998	61,304	0,005	0,999	67,347	0,005	0,999
58,643	0,006	0,998	60,441	0,001	0,998	67,605	0,004	0,999
58,827	0,007	0,998	67,455	0,006	0,999	67,460	0,002	1,000
58,086	0,007	0,998	58,043	0,007	0,998	65,206	0,006	0,999
57,885	0,005	0,998	57,954	0,006	0,998	66,657	0,003	0,999
56,461	0,006	0,997	57,864	0,005	0,998	66,334	0,008	0,999
58,703	0,004	0,998	65,214	0,012	0,998	67,658	0,002	0,998
57,287	0,003	0,997	65,112	0,013	0,998	66,624	0,009	0,998
59,377	0,004	0,998	65,010	0,014	0,999	67,053	0,006	0,999
57,223	0,006	0,997	58,833	0,004	0,999	67,337	0,004	0,999
57,339	0,006	0,999	59,801	0,003	0,999	68,017	0,004	0,999
59,587	0,005	0,999	58,491	-0,002	0,999	67,635	0,004	0,999
59,204	0,003	0,998	58,618	-0,002	0,999	67,268	0,005	0,999
58,677	0,004	0,999	58,745	-0,003	0,999	67,253	0,004	0,999
58,200	0,005	0,998	58,986	-0,003	0,999	69,920	0,002	0,999
56,771	0,008	0,996	59,227	-0,003	1,000	67,578	0,005	0,998
60,517	0,006	0,998	59,047	-0,002	0,999	67,888	0,004	0,998
60,743	0,006	0,998	59,667	-0,002	0,999	70,049	0,001	0,999
						67,556	0,009	0,999
						66,828	0,007	0,999
						70,178	-0,000	0,999

- **Analyse par chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP)**

Concernant la quantification des ellagitannins, les courbes d'étalonnage externe ont été obtenues à 254 nm à partir des trois polyphénols aux concentrations suivantes : punicalagine  $\alpha+\beta$  0,8-109 mg/L, punicaline  $\alpha+\beta$  0,8-100 mg/L et acide ellagique 0,4-30 mg/L. Les limites de détection et de quantification de ces composés établies à partir des injections d'échantillons sans analyte (blanc), répétées *a minima* trois fois par étalonnage, sont données dans le tableau **A2**.

Tableau A2 : Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) de l'acide ellagique, la punicalagine et la punicaline de six étalonnages.

	<b>Limite de détection</b>	<b>Limite de quantification</b>
	<b>LOD</b>	<b>LOQ</b>
	<b>mg/L</b>	<b>mg/L</b>
<b>Molécule: Acide ellagique</b>		
min	0,002	0,005
max	0,011	0,031
moy $\pm S_n$	0,007 $\pm$ 0,003	0,019 $\pm$ 0,009
<b>Molécule: Punicalagine</b>		
min	0,029	0,073
max	0,121	0,332
moy $\pm S_n$	0,060 $\pm$ 0,040	0,167 $\pm$ 0,116
<b>Molécule: Punicaline</b>		
min	0,014	0,039
max	0,109	0,306
moy $\pm S_n$	0,050 $\pm$ 0,043	0,134 $\pm$ 0,115

min : valeur minimale, max : valeur maximale, moy : moyenne,  $S_n$  : écart-type

- **Extraction de l'huile**

Pour valider la procédure d'extraction totale de l'huile, une quatrième extraction a été effectuée selon le protocole présenté dans le chapitre 2. Cet extrait du résidu de troisième extraction a été analysé par chromatographie en phase gazeuse (CPG) qui a montré la présence résiduelle des mono, di et triglycérides.

- **Analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

Deux échantillons ont été injectés trois fois et au vu de la répétabilité (tableau A3), les échantillons suivants ont été injectés une fois.

Tableau A3 : Répétabilité d'injection en chromatographie gazeuse pour deux échantillons 1 et 2, et trois injections.

Acide gras	Echantillon 1 (% rel. n=3)			Echantillon 2 (% rel. n=3)		
	min	max	moy ± S <sub>n</sub>	min	max	moy ± S <sub>n</sub>
Acide Myristique C14:0 (%)	0,024	0,029	0,027 ± 0,002	0,020	0,022	0,021 ± 0,001
Acide Palmitique C16:0 (%)	2,726	2,729	2,728 ± 0,002	2,628	2,648	2,637 ± 0,010
Acide Palmitoléique C16:1 (%)	0,000	0,000	0,000 ± 0,000	0,000	0,000	0,000 ± 0,000
Acide Stéarique C18:0 (%)	1,789	1,807	1,799 ± 0,009	1,768	1,782	1,775 ± 0,007
Acide Oléique C18:1n-9 c (%)	4,782	4,801	4,789 ± 0,011	4,748	4,762	4,755 ± 0,007
Acide Linoléique C18:2n-6 c (%)	5,937	5,961	5,949 ± 0,012	5,948	5,963	5,954 ± 0,008
Acide α-Linolénique C18:3n-3 c (%)	0,022	0,028	0,026 ± 0,004	0,022	0,027	0,025 ± 0,003
Acide Punicique C18:3n-5 c,t,c (%)	82,549	82,693	82,606 ± 0,076	82,537	82,648	82,586 ± 0,056
Acide Catalpique C18:3n-5 t,t,c (%)	0,472	0,501	0,491 ± 0,017	0,470	0,477	0,475 ± 0,004
Acide β-Eléostéarique C18:3n-5 t,t,t (%)	0,438	0,556	0,510 ± 0,064	0,627	0,666	0,648 ± 0,020
Acide Arachidique C20:0 (%)	0,409	0,419	0,413 ± 0,005	0,410	0,413	0,411 ± 0,002
Acide Eicosénoïque C20:1n-9 c (%)	0,397	0,408	0,404 ± 0,006	0,395	0,400	0,398 ± 0,003
Acide Béhénique C22:0 (%)	0,217	0,219	0,218 ± 0,001	0,268	0,274	0,270 ± 0,003
Acide Lignocérique C24:0 (%)	0,033	0,047	0,041 ± 0,007	0,031	0,051	0,043 ± 0,011

## **Évolution des températures moyennes et maximales pendant la fructification des grenades et corrélation avec la teneur en punicalagine des péricarpes de grenade**

La teneur en punicalagine des péricarpes de grenades issues des systèmes de culture étudiées dans chapitre 3 a été corrélée avec les températures mesurées localement. Ces températures ont été obtenues des stations météorologiques à proximité des 5 ou 6 parcelles étudiées.

La figure **A1-A** présente l'évolution des températures moyennes pendant le développement des grenades, c'est à dire entre le 30/04/2019 et le 09/10/2019. Les températures moyennes ont été moyennées sur la période de fructification des grenades et corrélées avec la teneur en punicalagine des péricarpes des deux variétés non traitées (figure **A1-B**) et traitées (figure **A1-C**).

La figure **A2-A** correspond aux variations des températures maximales pendant le développement des grenades. De la même manière que précédemment, la corrélation de ces températures maximales avec la teneur en punicalagine des grenades non traitées est présentée sur la figure **A2-B**, et celle des grenades traitées sur la figure **A2-C**.



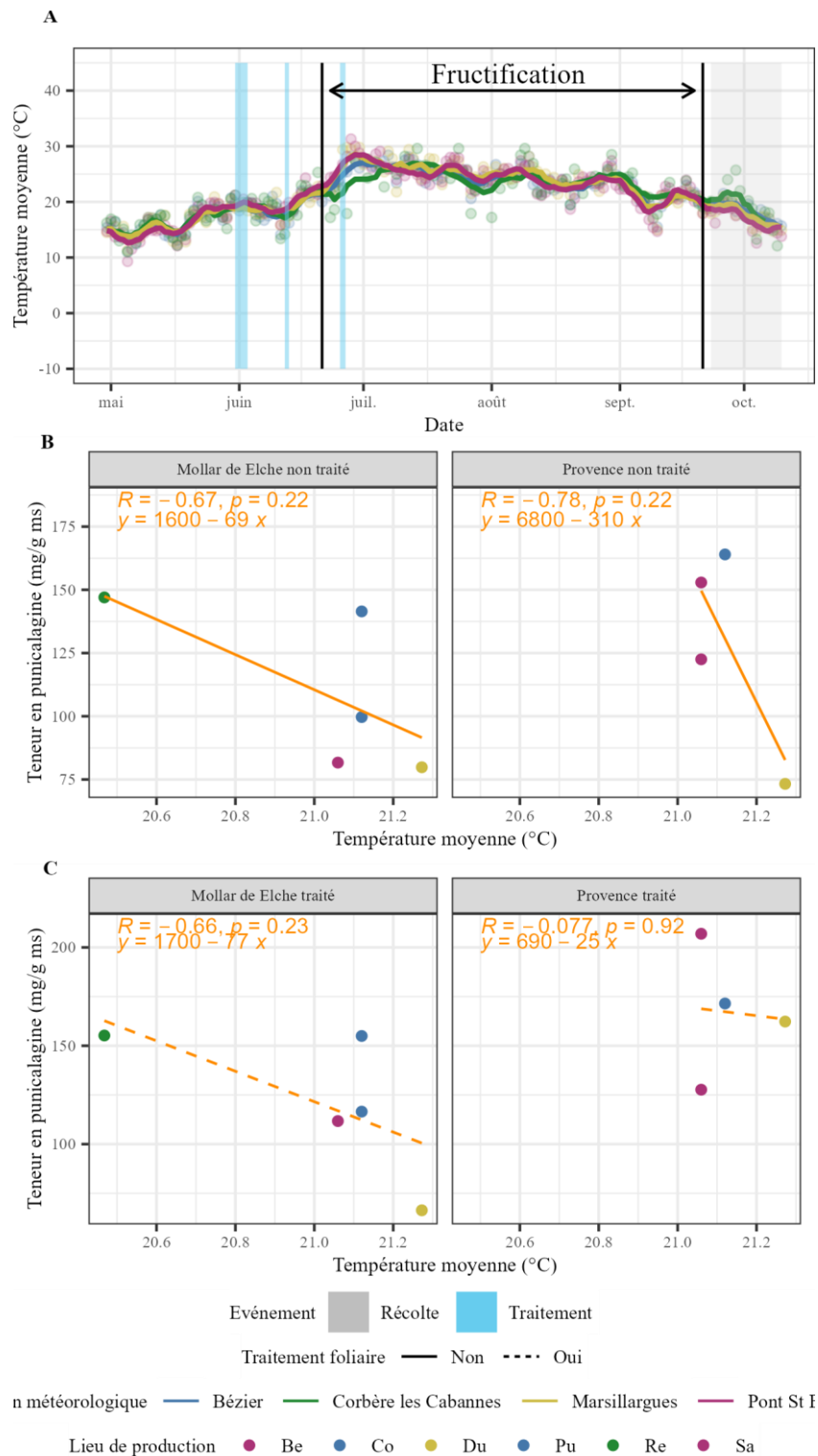


Figure A1 : Relation entre la teneur en punicalagine des péricarpes de grenade non traitées (B) et traitées (C) et les températures ambiantes moyennes mesurées sur les parcelles (A). Les parcelles sont colorées par station météorologique “Bézier” (“Co” et “Pu”) en bleu, “Corbère les Cabannes” (“Re”) en vert, “Marsillargues” (“Du”) en jaune et “Pont St Esprit” (“Be”, “Sa”) en rose. La corrélation entre la température et la teneur en punicalagine est représentée en orange, en traits pleins pour les lots de grenades non traitées (n=4 ou 5), et en traits pointillés pour les lots traités (n=4 ou 5).

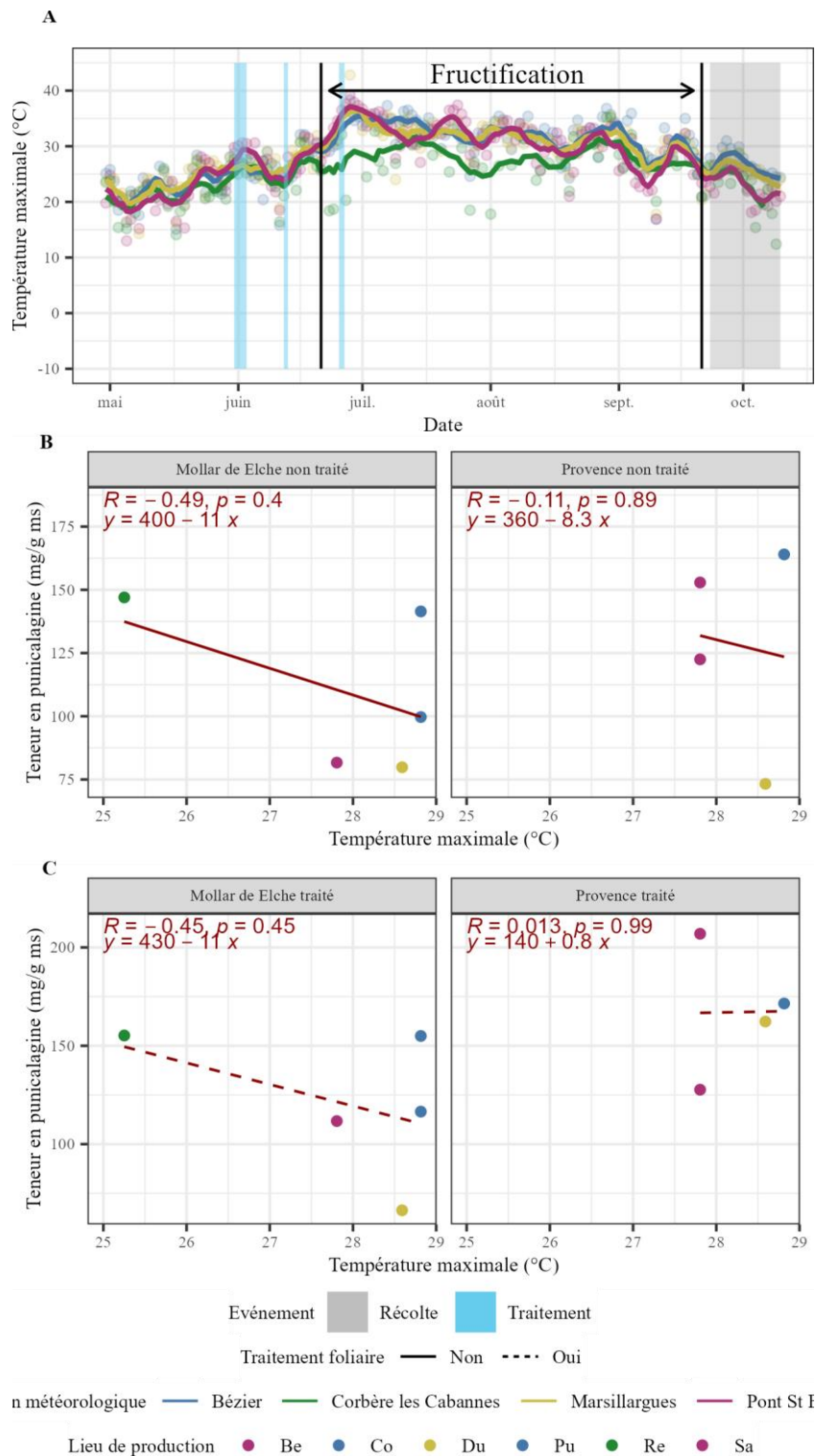


Figure A2 : Relation entre la teneur en punicalagine des péricarpes de grenade non traitées (B) et traitées (C) et les températures ambiantes maximales mesurées sur les parcelles (A). Les parcelles sont colorées par station météorologique “Bézier” (“Co” et “Pu”) en bleu, “Corbère les Cabannes” (“Re”) en vert, “Marsillargues” (“Du”) en jaune et “Pont St Esprit” (“Be”, “Sa”) en rose. La corrélation entre la température et la teneur en punicalagine est représentée en rouge, en traits pleins pour les lots de grenades non traitées (n=4 ou 5), et en traits pointillés pour les lots traités (n=4 ou 5).

## **Évolution des températures moyennes et maximales pendant la fructification des grenades et corrélation avec les teneurs en acides punicoïque et $\beta$ -éléostéarique des co-produits de pressage des grenades**

Les relations entre les teneurs en acide punicoïque et  $\beta$ -éléostéarique des co-produits de pressage des graines de grenade (chapitre 3) et les températures minimales, moyennes et maximales mesurées pendant le développement des fruits ont été évaluées par la méthode de Pearson.

Les évolutions des températures minimales (**A**), moyennes (**B**) et maximales (**C**) sont présentées sur la figure **A3**. Leurs corrélations avec les teneurs relatives en acide punicoïque sont présentées sur les figures **A4-A**, **A4-B** et **A4-C**, et celles avec les teneurs relatives en acide  $\beta$ -éléostéarique sur les figures **A5-A**, **A5-B** et **A5-C**, pour les températures minimales, moyennes et maximales, respectivement.

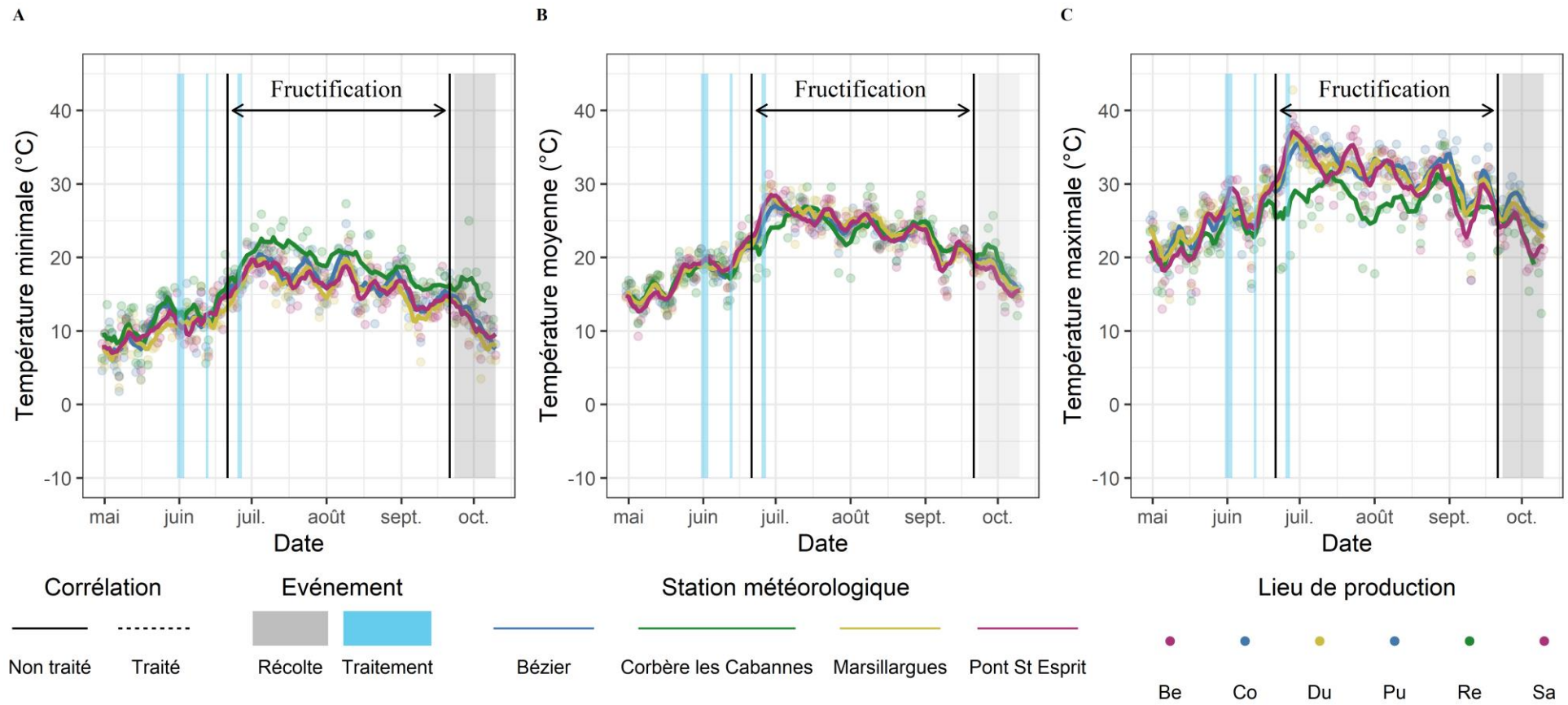


Figure A3 : Évolutions des températures minimales (A), moyennes (B) et maximales (C) pendant le développement des grenades. Les parcelles sont colorées par station météorologique “Bézier” (“Co” et “Pu”) en bleu, “Corbère les Cabannes” (“Re”) en vert, “Marsillargues” (“Du”) en jaune et “Pont St Esprit” (“Be”, “Sa”) en rose.

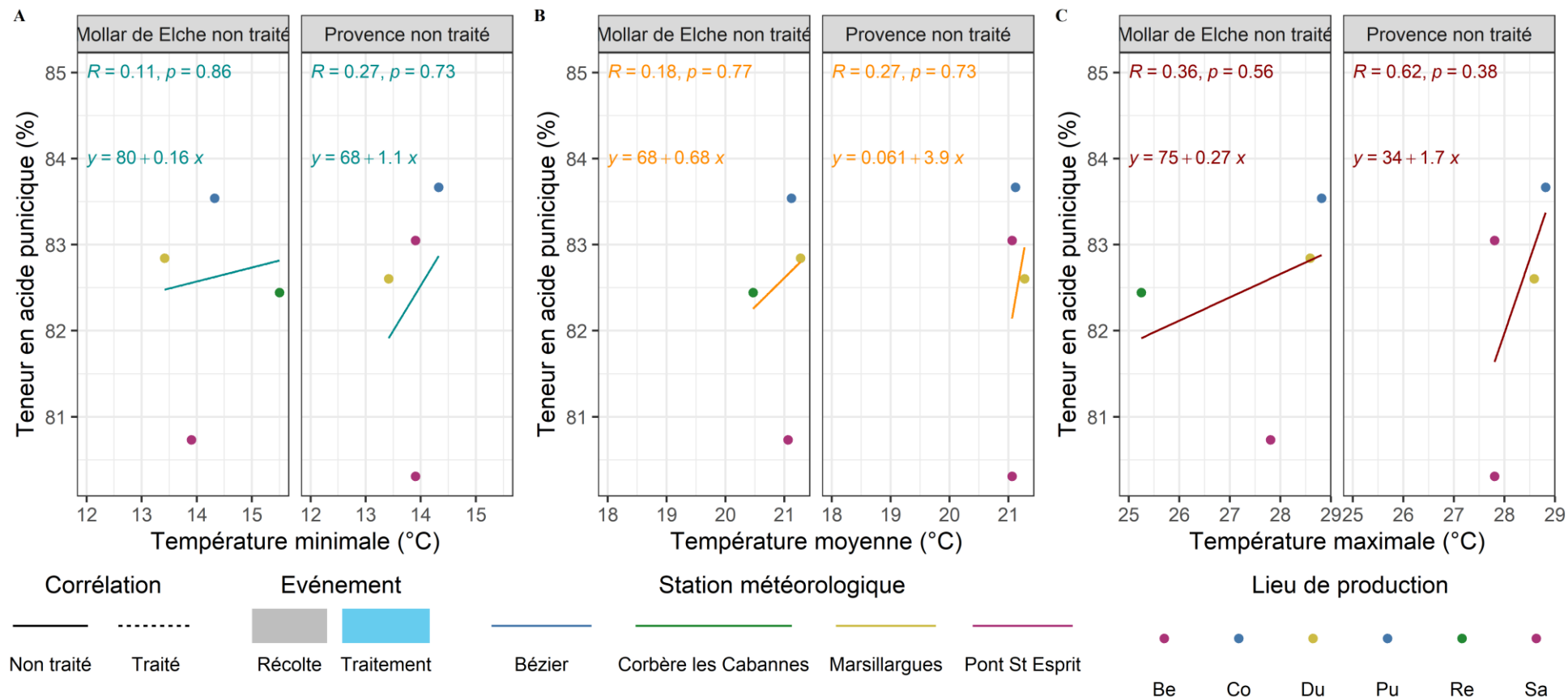


Figure A4 : Relation entre les teneurs en acide punique des co-produits de pressage des graines de grenade et les températures ambiantes minimale (A), moyenne (B) et maximale (C) mesurées sur les parcelles. Les corrélations aux températures minimales, moyennes et maximales sont représentées respectivement en bleu clair, orange et rouge. Les teneurs en acide gras sont exprimées en % des acides gras totaux identifiés dans les co-produits de pressage des graines.

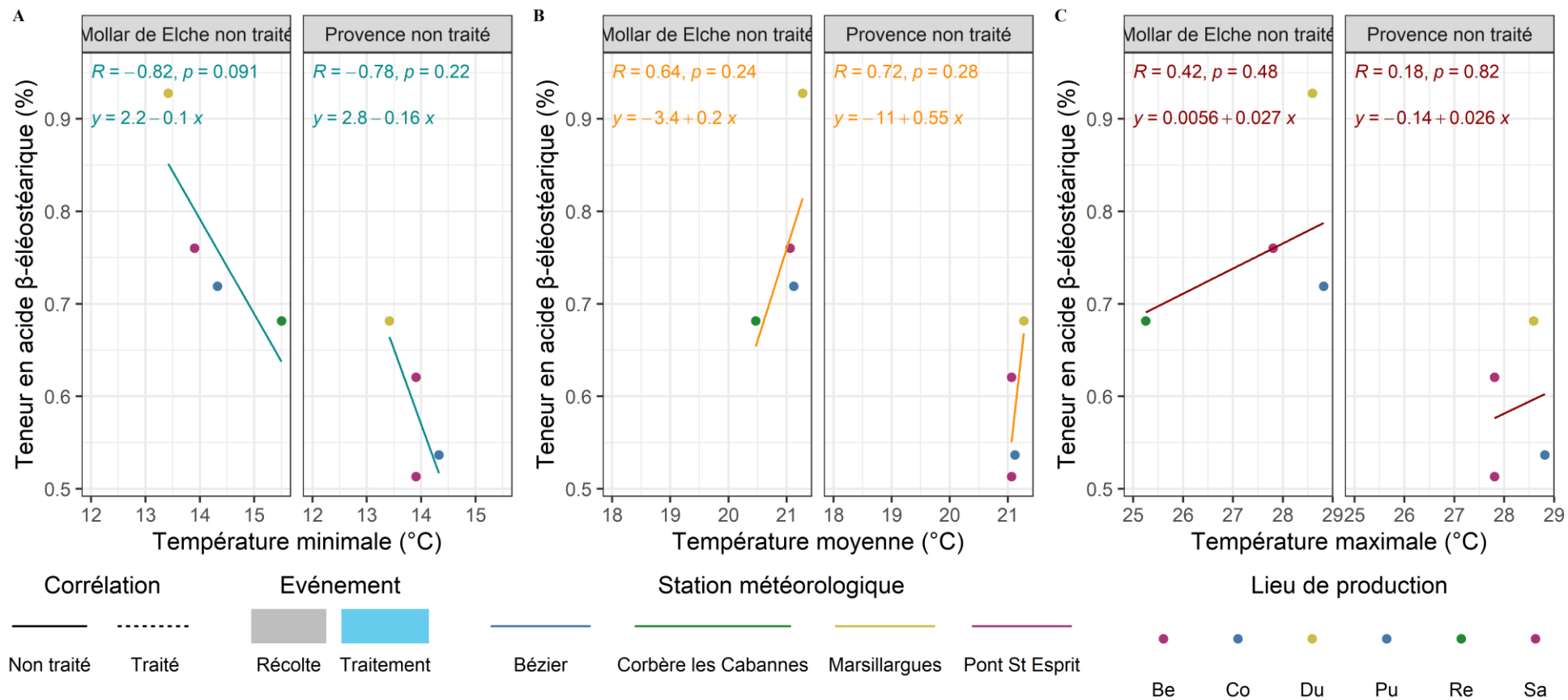


Figure A5 : Relation entre les teneurs en acide  $\beta$ -éléostéarique des co-produits de pressage des graines de grenade et les températures ambiantes minimale (A), moyenne (B) et maximale (C) mesurées sur les parcelles. Les corrélations aux températures minimales, moyennes et maximales sont représentées respectivement en bleu clair, orange et rouge. Les teneurs en acide gras sont exprimées en % des acides gras totaux identifiés dans les co-produits de pressage des graines.



## **BIBLIOGRAPHIE**

---



- [1] Holland D, Hatib K, Bar-Ya'akov I. Pomegranate : Botany, Horticulture, Breeding. *Horticultural Reviews* 2009;35:127–91.
- [2] Vincent L, Anushma PL, Vasugi C, Rekha A, Shiva B. Genetic Resources of Tropical Fruits. In: Rajasekharan PE, Rao VR, editors. *Conservation and Utilization of Horticultural Genetic Resources*, Singapore: Springer Singapore; 2019, p. 79–116. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-3669-0\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-13-3669-0_4).
- [3] Adiba A, Razouk R, Charafi J, Haddioui A, Hamdani A. Assessment of water stress tolerance in eleven pomegranate cultivars based on agronomic traits. *Agricultural Water Management* 2021;243:106419. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2020.106419>.
- [4] GIEC. Changements climatiques 2014: Rapport de synthèse. Contribution des Groupes de travail I, II et III au cinquième Rapport d'évaluation du Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat. GIEC. Genève, Suisse: 2014.
- [5] Galindo A, Collado-González J, Griñán I, Corell M, Centeno A, Martín-Palomo MJ, et al. Deficit irrigation and emerging fruit crops as a strategy to save water in Mediterranean semiarid agrosystems. *Agricultural Water Management* 2018;202:311–24. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2017.08.015>.
- [6] CBI. Exporting fresh pomegranates to Europe 2019.
- [7] Kahramanoglu I, Usanmaz S. *Pomegranate Production and Marketing*. Taylor & Francis Group. CRC Press; 2016. <https://doi.org/10.1201/b20151>.
- [8] Melgarejo P, Valero D, editors. *II International Symposium on the Pomegranate*. vol. 103. Zaragoza CIHEAM, Universidad Miguel Hernández, Spain: Lavoisier; 2012.
- [9] Institute TS. TurkStat Crop Production Statistics, Table-3 Production of fruits beverage and spices crops, 2015-2021. 2021.
- [10] Ministry of Agriculture of Peru. Perfil Productivo y Regional [Data visualization tool]. 2021.
- [11] Service Agrifood and Fisheries Information of Mexico. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola [Data visualization tool]. 2021.
- [12] National Horticulture Board of India. Area Production Statistics, Horticulture Crops. 2019.
- [13] Ministry of Agriculture Spain. Anuario de estadística, Resumen nacional del rendimiento, producción y destino, 2015-2019. 2020.
- [14] (*en cours de publication*) Lamotte A, Raynaud C, Alignan M. Pomegranate by-product valorization from field to food: Impact of storage and processing on by-product and their value added molecules. *Trends in Food Science & Technology* 2023.
- [15] Dossin AL. Fiches Techniques #1 : Produire des grenades en agriculture biologique en région Provence-Alpes-Côte d'Azur 2019.

- [16] Meynard J-M, Messéan A, Charlier A, Charrier F, Fares M, Le Bail M, et al. Freins et leviers à la diversification des cultures : étude au niveau des exploitations agricoles et des filières. *Oilseed & fats Crops and Lipids* 2013;20:D403. <https://doi.org/10.1051/ocl/2013007>.
- [17] Règlement (UE) No 1308/2013 du parlement européen et du conseil du 17 décembre 2013 portant organisation commune des marchés des produits agricoles et abrogeant les règlements (CEE) no 922/72, (CEE) no 234/79, (CE) no 1037/2001 et (CE) no 1234/2007 du Conseil 2013;L 347/671.
- [18] IPCC. *Climate Change 2022: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)*. Cambridge University Press 2022:3068.
- [19] Zimmerman RH. Juvenility and Flowering in Woody Plants: A Review. *HortScience* 1972;7:447–55.
- [20] Lamichhane JR. Rising risks of late-spring frosts in a changing climate. *Nature Climate Change* 2021;11:554–5. <https://doi.org/10.1038/s41558-021-01090-x>.
- [21] Sarkhosh A, Williamson JG. The Pomegranate. *EDIS* 2019;2019. <https://doi.org/10.32473/edis-mg056-2019>.
- [22] Soloklui AAG, Ershadi A, Fallahi E. Evaluation of Cold Hardiness in Seven Iranian Commercial Pomegranate (*Punica granatum* L.) Cultivars. *HortScience* 2012;47:1821–5. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.47.12.1821>.
- [23] Yazdanpanah P, Jonoubi P, Zeinalabedini M, Rajaei H, Ghaffari MR, Vazifeshenas MR, et al. Seasonal Metabolic Investigation in Pomegranate (*Punica granatum* L.) Highlights the Role of Amino Acids in Genotype- and Organ-Specific Adaptive Responses to Freezing Stress. *Frontiers in Plant Science* 2021;12.
- [24] Sirooeinejad B, Zamani Z, Fatahi MR. Study of physiological and biochemical responses to freezing stress in pomegranate (*Punica Granatum* L.) Trees during acclimation and deacclimation cycle. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 2020;95:341–55. <https://doi.org/10.1080/14620316.2019.1674699>.
- [25] Nasrabadi M, Ramezani A, Eshghi S, Kamgar-Haghighi AA, Vazifeshenas MR, Valero D. Biochemical changes and winter hardiness in pomegranate (*Punica granatum* L.) Trees grown under deficit irrigation. *Scientia Horticulturae* 2019;251:39–47. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.03.005>.
- [26] Lionello P, Malanotte-Rizzoli P, Boscolo R, Alpert P, Artale V, Li L, et al. The Mediterranean climate: An overview of the main characteristics and issues. *Developments in Earth and Environmental Sciences*, vol. 4, Elsevier; 2006, p. 1–26. [https://doi.org/10.1016/S1571-9197\(06\)80003-0](https://doi.org/10.1016/S1571-9197(06)80003-0).
- [27] Kotsias G, Lolis CJ, Hatzianastassiou N, Lionello P, Bartzokas A. An objective definition of seasons for the Mediterranean region. *International Journal of Climatology* 2021;41:E1889–905. <https://doi.org/10.1002/joc.6819>.

- [28] Elsayed MMAM, Belhouchette H, Crete X. Éclatement et qualité du fruit de la grenade (*Punica granatum* L.), affectée par l'irrigation et les pulvérisations de nutriments minéraux avant la récolte. Montpellier: CIHEAM-IAMM; 2019.
- [29] Pareek S, Valero D, Serrano M. Postharvest biology and technology of pomegranate. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2015;95:2360–79. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7069>.
- [30] Singh A, Shukla AK, Meghwal PR. Fruit Cracking in Pomegranate: Extent, Cause, and Management A Review. *International Journal of Fruit Science* 2020;20:S1234–53. <https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1784074>.
- [31] Al-Saif AM, Mosa WFA, Saleh AA, Ali MM, Sas-Paszt L, Abada HS, et al. Yield and Fruit Quality Response of Pomegranate (*Punica granatum*) to Foliar Spray of Potassium, Calcium and Kaolin. *Horticulturae* 2022;8:946. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8100946>.
- [32] Règlement (UE, Euratom) 2021/1163 du Parlement européen du 24 juin 2021 fixant le statut et les conditions générales d'exercice des fonctions du Médiateur (statut du Médiateur européen) et abrogeant la décision 94/262/CECA, CE, Euratom 2021;L253.
- [33] Bakeer SM. Effect of ammonium nitrate fertilizer and calcium chloride foliar spray on fruit cracking and sunburn of Manfalouty pomegranate trees. *Scientia Horticulturae* 2016;209:300–8. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.06.043>.
- [34] Hosein-Beigi M, Zarei A, Rostaminia M, Erfani-Moghadam J. Positive effects of foliar application of Ca, B and GA3 on the qualitative and quantitative traits of pomegranate (*Punica granatum* L.) Cv. “Malase-Torshe-Saveh.” *Scientia Horticulturae* 2019;254:40–7. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.04.081>.
- [35] Hegazi A, Samra NR, El-Baz EET, Khalil BM, Gawish MS. Improving Fruit Quality Of Manfaloty And Wonderfull Pomegranates By Using Bagging And Some Spray Treatments With Gibberellic Acid, Calcium Chloride And Kaolin. *Journal of Plant Production* 2014;5:779–92. <https://doi.org/10.21608/jpp.2014.55421>.
- [36] Abada H, Farag K, Elsheikh M, Nagy N. Reducing cracking and enhancing coloration and quality of Wonderful pomegranates cultivar by safe treatments. *Zagazig Journal of Agricultural Research* 2018;45:2018. <https://doi.org/10.21608/zjar.2018.48569>.
- [37] Singh RP, Sharma YP, Awasthi RP. Influence of different cultural practices on pre-mature fruit cracking of pomegranate. *Progressive Horticulture* 1990;22:92–6.
- [38] El-Khawaga A. Reduction in fruit cracking in Manfaluty pomegranate following a foliar application with paclobutrazol and zinc sulphate. *Journal of Applied Science Research* 2007;3:837–40.
- [39] Singh A, Burman U, Saxena A, Meghwal PR. Interactive effects of micronutrients, kaolin and mulching under drip irrigation system in managing fruit cracking of pomegranate (*Punica granatum*). *Acta Horticulturae* 2019:213–8.

- [40] Davarpanah S, Tehranifar A, Davarynejad G, Abadía J, Khorasani R. Effects of foliar applications of zinc and boron nano-fertilizers on pomegranate (*Punica granatum* cv. Ardestani) fruit yield and quality. *Scientia Horticulturae* 2016;210:57–64. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.07.003>.
- [41] Singh DB, Sharma BD, Bhargava R. Effect of boron and GA<sub>3</sub> to control fruit cracking in pomegranate (*Punica granatum*). *Current Agriculture* 2003;27:125–7.
- [42] Yılmaz C, Özgüven A. The effects of some plant nutrient, gibberellic acid and pinolene treatments on the yield, fruit quality and cracking in pomegranate. *Acta Horticulturae* 2009;818:205–12. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.818.30>.
- [43] Khalil H, Aly S. Cracking and fruit quality of pomegranate (*Punica granatum* L.) As affected by pre-harvest sprays of some growth regulators and mineral nutrients. *J Hort Sci Ornament Plants* 2013;5:71–6.
- [44] Sahu P, Sharma N, Sharma D. Effect of in-situ moisture conservation, forchlorfenuron and boron on growth, fruit cracking and yield of pomegranate cv. Kandhari under rainfed conditions of Himachal Pradesh. *Indian Journal of Horticulture* 2013;70:501–5.
- [45] Khadivi A, Mirheidari F, Moradi Y, Paryan S. Morphological variability of wild pomegranate (*Punica granatum* L.) Accessions from natural habitats in the Northern parts of Iran. *Scientia Horticulturae* 2020;264:109165. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109165>.
- [46] Melgarejo P, Núñez-Gómez D, Legua P, Martínez-Nicolás JJ, Almansa MS. Pomegranate (*Punica granatum* L.) A dry pericarp fruit with fleshy seeds. *Trends in Food Science & Technology* 2020;102:232–6. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.014>.
- [47] Evreinoff VA. Contribution à l'étude du Grenadier. *Journal d'agriculture tropicale et de botanique appliquée* 1957;4:124–38. <https://doi.org/10.3406/jatba.1957.2380>.
- [48] Viuda-Martos M, Fernández-López J, Pérez-Álvarez Ja. Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2010;9:635–54. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00131.x>.
- [49] Teixeira da Silva JA, Rana TS, Narzary D, Verma N, Meshram DT, Ranade SA. Pomegranate biology and biotechnology: A review. *Scientia Horticulturae* 2013;160:85–107. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.05.017>.
- [50] Dhinesh KV, Ramasamy D. Pomegranate Processing and Value Addition: Review. *Journal of Food Processing & Technology* 2016;07:1000565. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000565>.
- [51] Sreekumar S, Sithul H, Muraleedharan P, Azeez JM, Sreeharshan S. Pomegranate Fruit as a Rich Source of Biologically Active Compounds. *BioMed Research International* 2014;2014. <https://doi.org/10.1155/2014/686921>.

- [52] Ranjha MM, Shafique B, Wang L, Irfan S, Safdar MN, Murtaza MA, et al. A comprehensive review on phytochemistry, bioactivity and medicinal value of bioactive compounds of pomegranate (*Punica granatum*). *Advances in Traditional Medicine* 2021. <https://doi.org/10.1007/s13596-021-00566-7>.
- [53] Stiletto A, Trestini S. Factors behind consumers' choices for healthy fruits: A review of pomegranate and its food derivatives. *Agricultural and Food Economics* 2021;9:31. <https://doi.org/10.1186/s40100-021-00202-7>.
- [54] Rymon D. Mapping features of the global pomegranate market. *Acta Horticulturae* 2011;599–601. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.890.84>.
- [55] Montefusco A, Durante M, Migoni D, De Caroli M, Ilahy R, Pék Z, et al. Analysis of the Phytochemical Composition of Pomegranate Fruit Juices, Peels and Kernels: A Comparative Study on Four Cultivars Grown in Southern Italy. *Plants* 2021;10:2521. <https://doi.org/10.3390/plants10112521>.
- [56] Mena P, García-Viguera C. Stability of the Ellagitannin Fraction and Antioxidant Capacity of Varietal Pomegranate Juices. *Natural Product Communications* 2015;10:1934578X1501000. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501000656>.
- [57] Fawole OA, Opara UL. Developmental changes in maturity indices of pomegranate fruit: A descriptive review. *Scientia Horticulturae* 2013;159:152–61. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.05.016>.
- [58] Fischer U, Carle R, Kammerer D. Thermal stability of anthocyanins and colourless phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) Juices and model solutions. *Food Chemistry* 2013;138:1800–9.
- [59] Fischer U, Carle R, Kammerer D. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD/MSn. *Food Chemistry* 2011;127:807–21. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.156>.
- [60] Rinaldi M, Caligiani A, Borgese R, Palla G, Barbanti D, Massini R. The effect of fruit processing and enzymatic treatments on pomegranate juice composition, antioxidant activity and polyphenols content. *LWT - Food Science and Technology* 2013;53:355–9. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.02.015>.
- [61] Tzulker R, Glazer I, Bar-Ilan I, Holland D, Aviram M, Amir R. Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007;55:9559–70. <https://doi.org/10.1021/jf071413n>.
- [62] Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Martín-Sánchez A, Sánchez-Zapata E, Fernández-López J, Sendra E, et al. Chemical, physico-chemical and functional properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) Bagasses powder co-product. *Journal of Food Engineering* 2012;110:220–4. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.05.029>.

- [63] Mena P, García-Viguera C, Navarro-Rico J, Moreno DA, Bartual J, Saura D, et al. Phytochemical characterisation for industrial use of pomegranate (*Punica Granatum* L.) Cultivars grown in Spain: Selection of pomegranates for juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2011;91:1893–906. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4411>.
- [64] Mphahlele RR, Fawole OA, Mokwena LM, Opara UL. Effect of extraction method on chemical, volatile composition and antioxidant properties of pomegranate juice. *South African Journal of Botany* 2016;103:135–44. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.09.015>.
- [65] Alcaraz-Mármol F, Nuncio-Jáuregui N, García-Sánchez F, Martínez-Nicolás JJ, Hernández F. Characterization of twenty pomegranate (*Punica granatum* L.) Cultivars grown in Spain: Aptitudes for fresh consumption and processing. *Scientia Horticulturae* 2017;219:152–60. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.03.008>.
- [66] Fischer UA, Jaksch AV, Carle R, Kammerer DR. Influence of origin source, different fruit tissue and juice extraction methods on anthocyanin, phenolic acid, hydrolysable tannin and isolariciresinol contents of pomegranate (*Punica granatum* L.) Fruits and juices. *European Food Research and Technology* 2013;237:209–21. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-1981-2>.
- [67] Valdés A, Garcia-Serna E, Martínez-Abad A, Vilaplana F, Jimenez A, Garrigós MC. Gelatin-Based Antimicrobial Films Incorporating Pomegranate (*Punica granatum* L.) Seed Juice by-Product. *Molecules* 2019;25:166. <https://doi.org/10.3390/molecules25010166>.
- [68] Boggia R, Turrini F, Villa C, Lacapra C, Zunin P, Parodi B. Green extraction from pomegranate marcs for the production of functional foods and cosmetics. *Pharmaceuticals* 2016;9:11.
- [69] Cano-Lamadrid M, Lech K, Calin-Sanchez A, Rosa-Burgos EC, Figiel A, Wojdylo A, et al. Quality of pomegranate pomace as affected by drying method. *Journal of Food Science and Technology* 2018;55:1074–82. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-3022-9>.
- [70] Ye X, editor. *Phytochemicals in Citrus: Applications in Functional Foods*. Boca Raton: CRC Press; 2016. <https://doi.org/10.4324/9781315369068>.
- [71] Devahastin S, editor. *Food Microstructure and Its Relationship with Quality and Stability*. Woodhead Publishing; 2017.
- [72] Shabbir MA, Khan MR, Saeed M, Pasha I, Khalil AA, Siraj N. Punicic acid: A striking health substance to combat metabolic syndromes in humans. *Lipids in Health and Disease* 2017;16:99. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0489-3>.
- [73] Chisholm MJ, Hopkins CY. Fatty acid composition of some Cucurbitaceae seed oils. *Canadian Journal of Chemistry* 1964;42:560–4. <https://doi.org/10.1139/v64-082>.

- [74] Tulloch AP, Bergter L. Analysis of the conjugated trienoic acid containing oil from *Fevillea trilobata* by  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Lipids* 1979;14:996–1002. <https://doi.org/10.1007/BF02533436>.
- [75] Gaydou EM, Miralles J, Rasoazanokolona V. Analysis of conjugated octadecatrienoic acids in *Momordica balsamina* seed oil by GLC and  $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 1987;64:997–1000. <https://doi.org/10.1007/BF02542436>.
- [76] Lakshminarayana G, Rao KS, Klittur MH, Mahajanshetty CS. Occurrence of punicic acid in *Trichosanthes bracteata* and *Trichosanthes nervifolia* seed oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 1988;65:347–8. <https://doi.org/10.1007/BF02663074>.
- [77] Joh Y-G, Kim S-J, Christie WW. The structure of the triacylglycerols, containing punicic acid, in the seed oil of *Trichosanthes kirilowii*. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 1995;72:1037–42. <https://doi.org/10.1007/BF02660718>.
- [78] Holic R, Xu Y, Caldo KMP, Singer SD, Field CJ, Weselake RJ, et al. Bioactivity and biotechnological production of punicic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2018;102:3537–49. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8883-y>.
- [79] Smith CR. Occurrence of unusual fatty acids in plants. *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids* 1971;11:137–77. [https://doi.org/10.1016/0079-6832\(71\)90005-X](https://doi.org/10.1016/0079-6832(71)90005-X).
- [80] He Z, Chapital DC, Cheng HN, Thomas Klasson K, Olanya OM, Uknalis J. Application of tung oil to improve adhesion strength and water resistance of cottonseed meal and protein adhesives on maple veneer. *Industrial Crops and Products* 2014;61:398–402. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.07.031>.
- [81] Suksombat W, Boonmee T, Lounglawan P. Effects of various levels of conjugated linoleic acid supplementation on fatty acid content and carcass composition of broilers. *Poultry Science* 2007;86:318–24. <https://doi.org/10.1093/ps/86.2.318>.
- [82] Cho S, Ryu C, Yang J, Mbiriri DT, Choi C-W, Chae J-I, et al. Effect of Conjugated Linoleic Acid Feeding on the Growth Performance and Meat Fatty Acid Profiles in Broiler: Meta-analysis. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 2013;26:995–1002. <https://doi.org/10.5713/ajas.2013.13071>.
- [83] Jiang W, Nie S, Qu Z, Bi C, Shan A. The effects of conjugated linoleic acid on growth performance, carcass traits, meat quality, antioxidant capacity, and fatty acid composition of broilers fed corn dried distillers grains with solubles. *Poultry Science* 2014;93:1202–10. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03683>.
- [84] Khoddami A, Man YBC, Roberts TH. Physico-chemical properties and fatty acid profile of seed oils from pomegranate (*Punica granatum* L.) Extracted by cold pressing 2014;116:553–62.

- [85] Dalimov DN, Dalimova GN, Bhatt M. Chemical composition and lignins of tomato and pomegranate seeds. *Chemistry of Natural Compounds* 2003;39:37–40.
- [86] Goula AM, Lazarides HN. Integrated processes can turn industrial food waste into valuable food by-products and/or ingredients: The cases of olive mill and pomegranate wastes. *Journal of Food Engineering* 2015;167:45–50.
- [87] Kalamara E, Goula AM, Adamopoulou KG. An integrated process for utilization of pomegranate wastes Seeds. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2015;27:144–53.
- [88] Durdevic S, Milovanovic S, Savikin K, Ristic M, Menkovic N, Pljevljakusic D, et al. Improvement of supercritical CO<sub>2</sub> and n-hexane extraction of wild growing pomegranate seed oil by microwave pretreatment. *Industrial Crops & Products* 2017;104:21–7.
- [89] Tian Y, Xu Z, Zheng B, Martin Lo Y. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) Seed oil. *Ultrasonics Sonochemistry* 2013;20:202–8. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.07.010>.
- [90] Devatkal SK, Narsaiah K, Borah A. Anti-oxidant effect of extracts of kinnow rind, pomegranate rind and seed powders in cooked goat meat patties. *Meat Science* 2010;85:155–9. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.12.019>.
- [91] Topkafa M, Kara H, Sherazi STH. Evaluation of the Triglyceride Composition of Pomegranate Seed Oil by RP-HPLC Followed by GC-MS. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 2015;92:791–800. <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2652-1>.
- [92] Siano F, Addeo F, Volpe MG, Paolucci M, Picariello G. Oxidative Stability of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Seed Oil to Simulated Gastric Conditions and Thermal Stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2016;64:8369–78. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04611>.
- [93] Dimitrios B. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science & Technology* 2006;17:505–12. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.04.004>.
- [94] FAO. Fats and fatty acids in human nutrition: Report of an expert consultation. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2010.
- [95] Benatti P, Peluso G, Nicolai R, Calvani M. Polyunsaturated Fatty Acids: Biochemical, Nutritional and Epigenetic Properties. *Journal of the American College of Nutrition* 2004;23:281–302. <https://doi.org/10.1080/07315724.2004.10719371>.
- [96] Mohagheghi M, Rezaei K, Labbafi M, Ebrahimzadeh Mousavi SM. Pomegranate seed oil as a functional ingredient in beverages. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2011;113:730–6. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000334>.
- [97] Albrecht M, Jiang W, Kumi-Diaka J, Lansky EP, Gommersall LM, Patel A, et al. Pomegranate extracts potently suppress proliferation, xenograft growth, and



invasion of human prostate cancer cells. *Journal of Medicinal Food* 2004;7:274–83. <https://doi.org/10.1089/jmf.2004.7.274>.

[98] Amir R, Borochoy-Neori H, Tian L, Holland D. The biodiversity of different traits of pomegranate fruit peels from a broad collection of diverse cultivars. *Scientia Horticulturae* 2019;246:842–8. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.10.048>.

[99] Kaderides K, Kyriakoudi A, Mourtzinou I, Goula AM. Potential of pomegranate peel extract as a natural additive in foods. *Trends in Food Science & Technology* 2021;115:380–90. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.050>.

[100] Chen J, Liao C, Ouyang X, Kahramanoğlu I, Gan Y, Li M. Antimicrobial Activity of Pomegranate Peel and Its Applications on Food Preservation. *Journal of Food Quality* 2020;2020:1–8. <https://doi.org/10.1155/2020/8850339>.

[101] Bar-Ya'akov I, Tian L, Amir R, Holland D. Primary Metabolites, Anthocyanins, and Hydrolyzable Tannins in the Pomegranate Fruit. *Frontiers in Plant Science* 2019;10:620. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00620>.

[102] Andrade MA, Lima V, Sanches Silva A, Vilarinho F, Castilho MC, Khwaldia K, et al. Pomegranate and grape by-products and their active compounds: Are they a valuable source for food applications? *Trends in Food Science & Technology* 2019;86:68–84. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.010>.

[103] Magangana TP, Makunga NP, Fawole OA, Opara UL. Processing Factors Affecting the Phytochemical and Nutritional Properties of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel Waste: A Review 2020:34.

[104] Ismail HA, Hameed AM, Refaey MM, Sayqal A, Aly AA. Rheological, physio-chemical and organoleptic characteristics of ice cream enriched with Doum syrup and pomegranate peel. *Arabian Journal of Chemistry* 2020;13:7346–56. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.08.012>.

[105] ANSES. Glucides et santé : Etat des lieux, évaluation et recommandations. Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES); 2004.

[106] REPORT A. The Definition of Dietary Fiber. Report of the Dietary Fiber Definition Committee to the Board of Directors of the American Association Of Cereal Chemists. *Cereal Food World* 2001;46:112–26.

[107] Dourou M, Economou CN, Aggeli L, Janák M, Valdés G, Elezi N, et al. Bioconversion of pomegranate residues into biofuels and bioactive lipids. *Journal of Cleaner Production* 2021;323:129193. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.129193>.

[108] Dafny-Yalin M, Glazer I, Bar-Ilan I, Kerem Z, Holland D, Amir R. Color, Sugars and Organic Acids Composition in Aril Juices and Peel Homogenates Prepared from Different Pomegranate Accessions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010;58:4342–52. <https://doi.org/10.1021/jf904337t>.

- [109] Papini-Terzi FS, Rocha FR, Vêncio RZ, Felix JM, Branco DS, Waclawovsky AJ, et al. Sugarcane genes associated with sucrose content. *BMC Genomics* 2009;10:120. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-120>.
- [110] Cummings JH, Stephen AM. Carbohydrate terminology and classification. *European Journal of Clinical Nutrition* 2007;61:S5–18. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602936>.
- [111] Abid M, Cheikhrouhou S, Renard C, Bureau S, Cuvelier G, Attia H, et al. Characterization of pectins extracted from pomegranate peel and their gelling properties. *Food Chemistry* 2017;215:318–25.
- [112] Hasnaoui N, Wathelet B, Jimenez-Araujo A. Valorization of pomegranate peel from 12 cultivars: Dietary fibre composition, antioxidant capacity and functional properties. *Food Chemistry* 2014;160:196–203. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.089>.
- [113] Moorthy JG, Maran JP, Surya SM, Naganyashree S, Shivamathi CS. Response surface optimization of ultrasound assisted extraction of pectin from pomegranate peel. *International Journal of Biological Macromolecules* 2015;72:1323–8.
- [114] Wuestenberg T. *Cellulose and Cellulose Derivatives in the Food Industry: Fundamentals and Applications*. Wiley-VCH. 2014.
- [115] Farhat W, Venditti R, Quick A, Taha M, Mignard N, Becquart F, et al. Hemicellulose extraction and characterization for applications in paper coatings and adhesives. *Industrial Crops and Products* 2017;107:370–7. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.055>.
- [116] Pagliaro M. Pectin production and global market. *Agro FOOD Industry Hi Tech* 2016;27:5.
- [117] Kaya M, Sousa AG, Crépeau M-J, Sørensen SO, Ralet M-C. Characterization of citrus pectin samples extracted under different conditions: Influence of acid type and pH of extraction. *Annals of Botany* 2014;114:1319–26. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu150>.
- [118] Bhushan S, Kalia K, Sharma M, Singh B, Ahuja PS. Processing of Apple Pomace for Bioactive Molecules. *Critical Reviews in Biotechnology* 2008;28:285–96. <https://doi.org/10.1080/07388550802368895>.
- [119] Khatib M, Giuliano C, Rossi F, Adessi A, Al-Tamimi A, Mazzola G, et al. Polysaccharides from by-products of the Wonderful and Laffan pomegranate varieties: New insight into extraction and characterization. *Food Chemistry* 2017;235:58–66. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.041>.
- [120] Aviram M, Volkova N, Coleman R, Dreher M, Reddy MK, Ferreira D, et al. Pomegranate Phenolics from the Peels, Arils, and Flowers Are Antiatherogenic: Studies *in Vivo* in Atherosclerotic Apolipoprotein E-Deficient (E<sup>0</sup>) Mice and *in Vitro* in Cultured Macrophages and Lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008;56:1148–57. <https://doi.org/10.1021/jf071811q>.

- [121] Collin S, Crouzet J. Polyphénols et procédés. Tec&Doc. Lavoisier; 2011.
- [122] Anesini C, Ferraro GE, Filip R. Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Commercially Available Tea ( *Camellia Sinensis* ) in Argentina. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2008;56:9225–9. <https://doi.org/10.1021/jf8022782>.
- [123] Romeo FV, Ballistreri G, Fabroni S, Pangallo S, Nicosia MGLD, Schena L, et al. Chemical Characterization of Different Sumac and Pomegranate Extracts Effective against *Botrytis cinerea* Rots. Molecules 2015;20:11941–58. <https://doi.org/10.3390/molecules200711941>.
- [124] Lipińska L, Klewicka E, Sójka M. The structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: A general review. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria 2014;13:289–99. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2014.3.7>.
- [125] Surek E, Nilufer-Erdil D. Phenolic contents, antioxidant activities and potential bioaccessibilities of industrial pomegranate nectar processing wastes. International Journal of Food Science & Technology 2016;51:231–9. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13000>.
- [126] Zahin M, Aqil F, Ahmad I. Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of *Punica granatum* L. Peel extracts. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 2010;703:99–107. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.08.001>.
- [127] Rongai D, Pulcini P, Di Lernia G, Nota P, Preka P, Milano F. Punicalagin Content and Antifungal Activity of Different Pomegranate (*Punica granatum* L.) Genotypes. Horticulturae 2019;5:52. <https://doi.org/10.3390/horticulturae5030052>.
- [128] Glazer I, Masaphy S, Marciano P, Bar-Ilan I, Holland D, Kerem Z, et al. Partial Identification of Antifungal Compounds from *Punica granatum* Peel Extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2012;60:4841–8. <https://doi.org/10.1021/jf300330y>.
- [129] Foss SR, Nakamura CV, Ueda-Nakamura T, Cortez DA, Endo EH, Dias Filho BP. Antifungal activity of pomegranate peel extract and isolated compound punicalagin against dermatophytes. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 2014;13:32. <https://doi.org/10.1186/s12941-014-0032-6>.
- [130] Cao K, Xu J, Pu W, Dong Z, Sun L, Zang W, et al. Punicalagin, an active component in pomegranate, ameliorates cardiac mitochondrial impairment in obese rats via AMPK activation. Scientific Reports 2015;5:14014. <https://doi.org/10.1038/srep14014>.
- [131] Han DH, Lee MJ, Kim JH. Antioxidant and Apoptosis-inducing Activities of Ellagic Acid. Anticancer Research 2006:6.
- [132] Duche D, Cotovio J, Catroux P. Utilisation de l'acide ellagique comme agent cosmétique anti-pollution. CA2408383A1, 2001.

- [133] Bonte F, Saunois A. Utilisation de l'acide ellagique et de ses derives en cosmetique et en dermatologie. EP1021161A1, 2000.
- [134] Özer Ö, Mutlu B, Kıvçak B. Antityrosinase Activity of Some Plant Extracts and Formulations Containing Ellagic Acid. *Pharmaceutical Biology* 2007;45:519–24. <https://doi.org/10.1080/13880200701446746>.
- [135] Shaik MM, Kowshik M. Ellagic acid containing collagen-chitosan scaffolds as potential antioxidative bio-materials for tissue engineering applications. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 2019;68:208–15. <https://doi.org/10.1080/00914037.2018.1443927>.
- [136] Goriparti S, Harish MNK, Sampath S. Ellagic acid a novel organic electrode material for high capacity lithium ion batteries. *Chemical Communications* 2013;49:7234. <https://doi.org/10.1039/c3cc43194k>.
- [137] Liang X, Yun J, Wang Y, Xiang H, Sun Y, Feng Y, et al. A new high-capacity and safe energy storage system: Lithium-ion sulfur batteries. *Nanoscale* 2019;11:19140–57. <https://doi.org/10.1039/C9NR05670J>.
- [138] Lu J, Yuan Q. A new method for ellagic acid production from pomegranate husk. *Journal of Food Process Engineering* 2008;31:443–54. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2007.00169.x>.
- [139] Blackburn R, Rayner C, Benohoud M. Industrial application of anthocyanins extracted from food waste. 20th Annual Green Chemistry & Engineering Conference, Portland, Oregon, USA: 2016, p. 24.
- [140] de Sales N, Silva da Costa L, Carneiro T, Minuzzo D, Oliveira F, Cabral L, et al. Anthocyanin-Rich Grape Pomace Extract (*Vitis vinifera* L.) From Wine Industry Affects Mitochondrial Bioenergetics and Glucose Metabolism in Human Hepatocarcinoma HepG2 Cells. *Molecules* 2018;23:611. <https://doi.org/10.3390/molecules23030611>.
- [141] Kennas A, Amellal-Chibane H, Kessal F, Halladj F. Effect of pomegranate peel and honey fortification on physicochemical, physical, microbiological and antioxidant properties of yoghurt powder. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* 2020;19:99–108. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2018.07.001>.
- [142] Brighenti V, Groothuis SF, Prencipe FP, Amir R, Benvenuti S, Pellati F. Metabolite fingerprinting of *Punica granatum* L. (Pomegranate) polyphenols by means of high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization-mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A* 2017;1480:20–31. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.12.017>.
- [143] Singh J, Bargale PC. Development of a small capacity double stage compression screw press oil expression. *Journal of Food Engineering* 2000;43:75–82. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(99\)00134-X](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(99)00134-X).

- [144] Eikani MH, Golmohammad F, Homami SS. Extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) Seed oil using superheated hexane. *Food and Bioproducts Processing* 2012;90:32–6. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.01.002>.
- [145] Schubert SY, Lansky EP, Neeman I. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology* 1999;66:11–7.
- [146] ISO. ISO 659:2009. Oilseeds Determination of oil content (Reference method) 2009.
- [147] Leybros J, Frémaux P. Extraction solide-liquide. Techniques et appareillage. *Techniques de l'Ingénieur* 1990;J2782. <https://doi.org/10.51257/a-v1-j2782>.
- [148] Abbasi H, Rezaei K, Rashidi L. Extraction of Essential Oils From the Seeds of Pomegranate Using Organic Solvents and Supercritical CO<sub>2</sub>. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 2008;85:83–9. <https://doi.org/10.1007/s11746-007-1158-x>.
- [149] Zhang Q-W, Lin L-G, Ye W-C. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine* 2018;13:20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>.
- [150] Naviglio D, Scarano P, Ciaravolo M, Gallo M. Rapid Solid-Liquid Dynamic Extraction (RSLDE): A Powerful and Greener Alternative to the Latest Solid-Liquid Extraction Techniques. *Foods* 2019;8:245. <https://doi.org/10.3390/foods8070245>.
- [151] Ferraz TPL, Fiúza MC, dos Santos MLA, Pontes de Carvalho L, Soares NM. Comparison of six methods for the extraction of lipids from serum in terms of effectiveness and protein preservation. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2004;58:187–93. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2003.10.008>.
- [152] Stamenković OS, Djalović IG, Kostić MD, Mitrović PM, Veljković VB. Optimization and kinetic modeling of oil extraction from white mustard (*Sinapis alba* L.) seeds. *Industrial Crops and Products* 2018;121:132–41. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.001>.
- [153] Goula AM. Ultrasound-assisted extraction of pomegranate seed oil Kinetic modeling. *Journal of Food Engineering* 2013;117:492–8. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.10.009>.
- [154] Petigny L, Périno-Issartier S, Wajsman J, Chemat F. Batch and Continuous Ultrasound Assisted Extraction of Boldo Leaves (*Peumus boldus* Mol.). *International Journal of Molecular Sciences* 2013;14:5750–64. <https://doi.org/10.3390/ijms14035750>.
- [155] Abbasi H, Rezaei K, Emamdjomeh Z, Mousavi SME. Effect of various extraction conditions on the phenolic contents of pomegranate seed oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2008;110:435–40. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700199>.

- [156] Liu G, Xu X, Hao Q, Gao Y. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction optimization of pomegranate (*Punica granatum* L.) Seed oil using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology* 2009;42:1491–5. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.04.011>.
- [157] Zhong C, Zu Y, Zhao X, Li Y, Ge Y, Wu W, et al. Effect of superfine grinding on physicochemical and antioxidant properties of pomegranate peel. *International Journal of Food Science & Technology* 2016;51:212–21. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12982>.
- [158] Qu W, Pan Z, Ma H. Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. *Journal of Food Engineering* 2010;99:16–23. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.020>.
- [159] Santos MP, Souza MC, Sumere BR, da Silva LC, Cunha DT, Bezerra RMN, et al. Extraction of bioactive compounds from pomegranate peel (*Punica granatum* L.) With pressurized liquids assisted by ultrasound combined with an expansion gas. *Ultrasonics Sonochemistry* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.02.021>.
- [160] Sumere BR, de Souza MC, dos Santos MP, Bezerra RMN, da Cunha DT, Martinez J, et al. Combining pressurized liquids with ultrasound to improve the extraction of phenolic compounds from pomegranate peel (*Punica granatum* L.). *Ultrasonics Sonochemistry* 2018;48:151–62. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.05.028>.
- [161] Kharchoufi S, Licciardello F, Siracusa L, Muratore G, Hamdi M, Restuccia C. Antimicrobial and antioxidant features of ‘Gabsi’ pomegranate peel extracts. *Industrial Crops and Products* 2018;111:345–52. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.037>.
- [162] Talekar S, Patti AF, Vijayraghavan R, Arora A. An integrated green biorefinery approach towards simultaneous recovery of pectin and polyphenols coupled with bioethanol production from waste pomegranate peels. *Bioresource Technology* 2018;266:322–34. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.072>.
- [163] Talekar S, Patti AF, Vijayraghavan R, Arora A. Complete Utilization of Waste Pomegranate Peels To Produce a Hydrocolloid, Punicalagin Rich Phenolics, and a Hard Carbon Electrode. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 2018;6:16363–74. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b03452>.
- [164] Mushtaq MY, Choi YH, Verpoorte R, Wilson EG. Extraction for Metabolomics: Access to The Metabolome. *Phytochemical Analysis* 2014;25:291–306. <https://doi.org/10.1002/pca.2505>.
- [165] Galanakis CM, Goulas V, Tsakona S, Manganaris GA, Gekas V. A Knowledge Base for The Recovery of Natural Phenols with Different Solvents. *International Journal of Food Properties* 2013;16:382–96. <https://doi.org/10.1080/10942912.2010.522750>.
- [166] El-Hadary AE, Ramadan MF. Phenolic profiles, antihyperglycemic, antihyperlipidemic, and antioxidant properties of pomegranate ( *Punica Granatum* )

peel extract. *Journal of Food Biochemistry* 2019;43:e12803. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12803>.

[167] Masci A, Coccia A, Lendaro E, Mosca L, Paolicelli P, Cesa S. Evaluation of different extraction methods from pomegranate whole fruit or peels and the antioxidant and antiproliferative activity of the polyphenolic fraction. *Food Chemistry* 2016;202:59–69. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.106>.

[168] Malviya S, Arvind, Jha A, Hettiarachchy N. Antioxidant and antibacterial potential of pomegranate peel extracts. *Journal of Food Science and Technology* 2014;51:4132–7. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-0956-4>.

[169] Fawole OA, Opara UL. Stability of total phenolic concentration and antioxidant capacity of extracts from pomegranate co-products subjected to in vitro digestion. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2016;16:358. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1343-2>.

[170] Ghosh S, Chatterjee J, Hazra A. Comparative evaluation of in vitro antioxidant activities and high-performance liquid chromatography fingerprinting of fruit peels collected from food processing industry wastes. *Pharmacognosy Research* 2019;11:346. [https://doi.org/10.4103/pr.pr\\_13\\_19](https://doi.org/10.4103/pr.pr_13_19).

[171] da Silva Veloso F, Caleja C, Calhelha RC, Pires TCS, Alves MJ, Barros L, et al. Characterization and Application of Pomegranate Epicarp Extracts as Functional Ingredients in a Typical Brazilian Pastry Product. *Molecules* 2020;25:1481. <https://doi.org/10.3390/molecules25071481>.

[172] Khatib M, Innocenti M, Giuliani C, Al-Tamimi A, Romani A, Mulinacci N. Mesocarp and Exocarp of Laffan and Wonderful Pomegranate Varieties: By-Products as a Source of Ellagitannins. *International Journal of Food and Nutritional Science* 2017;4:60–6. <https://doi.org/10.15436/2377-0619.17.1465>.

[173] Regaieg H, Bouajila M, Hajji L, Larayadh A, Chiheni N, Guessmi-Mzoughi I, et al. Evaluation of pomegranate ( *Punica Granatum* L. Var. *Gabsi* ) peel extract for control of root-knot nematode *Meloidogyne Javanica* on tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 2017;50:839–49. <https://doi.org/10.1080/03235408.2017.1396721>.

[174] Kazemi M, Karim R, Mirhosseini H, Hamid AA. Optimization of pulsed ultrasound-assisted technique for extraction of phenolics from pomegranate peel of Malas variety: Punicalagin and hydroxybenzoic acids. *Food Chemistry* 2016;206:156–66.

[175] Alexandre EMC, Araújo P, Duarte MF, de Freitas V, Pintado M, Saraiva JA. Experimental Design, Modeling, and Optimization of High-Pressure-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Pomegranate Peel. *Food and Bioprocess Technology* 2017;10:886–900. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1867-6>.

[176] Alexandre E, Silva S, Santos S, Silvestre A, Duarte M, Saraiva J, et al. Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts performed by high pressure and

enzymatic assisted extraction. *Food Research International* 2019;115:167–76. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.044>.

[177] Pan Z, Qu W, Ma H, Atungulu GG, McHugh TH. Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. *Ultrasonics Sonochemistry* 2011;18:1249–57. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.01.005>.

[178] Talekar S, Patti AF, Vijayraghavan R, Arora A. Recyclable enzymatic recovery of pectin and punicalagin rich phenolics from waste pomegranate peels using magnetic nanobiocatalyst. *Food Hydrocolloids* 2019;89:468–80. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.009>.

[179] Drogoudi P, Pantelidis G, Manganaris A. Morphological and physiological characteristics in pomegranate cultivars with different yields. In: Melgarejo P, Valero D, editors. *II International Symposium on the Pomegranate*, vol. 103, Zaragoza CIHEAM, Universidad Miguel Hernández, Spain: Lavoisier; 2012, p. 67–9.

[180] Meziane ZK, Elothmani D, Benhadja LB. Morphological and physicochemical characteristics of three pomegranate cultivars (*Punica Granatum* L.) Grown in northern Algeria. *Fruits* 2016;71:17–26. <https://doi.org/10.1051/fruits/2015044>.

[181] Giordani E, Berti M, Yaqubi MR, Stanikzai S, Amad A, Zadran B, et al. Selected pomegranate germplasm from Afghanistan: Morphological variability and relationship among collected accessions. *Advances in Horticultural Science* 2017:225–230 Pages. <https://doi.org/10.13128/AHS-20348>.

[182] El-Shyimy N, Shekeeb L, Abu-Tor E, Hammard S. Effect of storage on the physical and organoleptic properties of frozen and canned pomegranate juice. *Journal of Agricultural Science, Mansoura University* 2005;30:5381–92.

[183] Szychowski PJ, Frutos MJ, Burló F, Pérez-López AJ, Carbonell-Barrachina AA, Hernández F. Instrumental and sensory texture attributes of pomegranate arils and seeds as affected by cultivar. *LWT - Food Science and Technology* 2015;60:656–63. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.053>.

[184] Fernandes L, Pereira JA, López-Cortés I, Salazar DM, Ramalhosa E, Casal S. Fatty acid, vitamin E and sterols composition of seed oils from nine different pomegranate (*Punica granatum* L.) Cultivars grown in Spain. *Journal of Food Composition and Analysis* 2015;39:13–22. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.11.006>.

[185] Fadavi A, Barzegar M, Hossein Azizi M. Determination of fatty acids and total lipid content in oilseed of 25 pomegranates varieties grown in Iran. *Journal of Food Composition and Analysis* 2006;19:676–80. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.09.002>.

[186] Elfalleh W, Ying M, Nasri N, Sheng-Hua H, Guasmi F, Ferchichi A. Fatty acids from Tunisian and Chinese pomegranate (*Punica granatum* L.) seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2011;62:200–6. <https://doi.org/10.3109/09637486.2010.526932>.



- [187] Peng Y. Comparative analysis of the biological components of pomegranate seed from different cultivars. *International Journal of Food Properties* 2019;22:784–94. <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1609028>.
- [188] Maity A, Gaikwad N, Babu KD, Sarkar A, Patil P. Impact of zinc and boron foliar application on fruit yield, nutritional quality and oil content of three pomegranate (*Punica Granatum* L.) cultivars. *Journal of Plant Nutrition* 2021;44:1841–52. <https://doi.org/10.1080/01904167.2021.1884711>.
- [189] Ferrara G, Giancaspro A, Mazzeo A, Giove SL, Matarrese AMS, Pacucci C, et al. Characterization of pomegranate (*Punica granatum* L.) Genotypes collected in Puglia region, Southeastern Italy. *Scientia Horticulturae* 2014;178:70–8. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.08.007>.
- [190] Turtygin AV, Deineka VI, Deineka LA. Determination of the triglyceride composition of pomegranate seed oil by reversed-phase HPLC and spectrophotometry. *Journal of Analytical Chemistry* 2013;68:558–63. <https://doi.org/10.1134/S1061934813060142>.
- [191] Özgül-Yücel S. Determination of conjugated linolenic acid content of selected oil seeds grown in Turkey. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 2005;82:893–7. <https://doi.org/10.1007/s11746-005-1161-7>.
- [192] Hernandez F, Melgarejo P, Olias JM, Artés F. Fatty acid composition and total lipid content of seed oil from the commercial pomegranate cultivars. *Options Méditerranéennes Ser A* 2000;42:205–9.
- [193] Alcaraz-Marmol F, Nuncio-Jauregui N, Calin-Sanchez A, Carbonell-Barrachina A, Martinez JJ, Hernandez F. Determination of fatty acid composition in arils of 20 pomegranates cultivars grown in Spain. *Scientia Horticulturae* 2015;197:712–8.
- [194] Saad H, Charrier-El Bouhtoury F, Pizzi A, Rode K, Charrier B, Ayed N. Characterization of pomegranate peels tannin extractives. *Industrial Crops and Products* 2012;40:239–46. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.02.038>.
- [195] Galaz P, Valdenegro M, Ramirez C, Nunez H, Almonacid S, Simpson R. Effect of drum drying temperature on drying kinetic and polyphenol contents in pomegranate peel. *Journal of Food Engineering* 2017;208:19–27.
- [196] Gozlekçi S, Saraçoğlu O, Onursal E, Özgen M. Total phenolic distribution of juice, peel, and seed extracts of four pomegranate cultivars. *Pharmacognosy Magazine* 2011;7:161. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.80681>.
- [197] Yan L, Zhou X, Shi L, Shalimu D, Ma C, Liu Y. Phenolic profiles and antioxidant activities of six Chinese pomegranate (*Punica Granatum* L.) cultivars. *International Journal of Food Properties* 2017;20:S94–107. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1289960>.

- [198] Qin G, Xu C, Ming R, Tang H, Guyot R, Kramer EM, et al. The pomegranate (*Punica granatum* L.) Genome and the genomics of punicalagin biosynthesis. *The Plant Journal* 2017;91:1108–28. <https://doi.org/10.1111/tpj.13625>.
- [199] Attanayake R, Eeswaran R, Rajapaksha R, Weerakkody P, Bandaranayake PCG. Biochemical Composition and Expression of Anthocyanin Biosynthetic Genes of a Yellow Peeled and Pinkish Ariled Pomegranate (*Punica granatum* L.) Cultivar are Differentially Regulated in Response to Agro-Climatic Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2018;66:8761–71. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02909>.
- [200] Luo X, Cao S, Hao Z, Hou L, Cao D, Zhang J, et al. Analysis of genetic structure in a large sample of pomegranate (*Punica Granatum* L.) Using fluorescent SSR markers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 2018;93:659–65. <https://doi.org/10.1080/14620316.2018.1432994>.
- [201] Harel-Beja R, Tian L, Freilich S, Habashi R, Borochoy-Neori H, Lahav T, et al. Gene expression and metabolite profiling analyses of developing pomegranate fruit peel reveal interactions between anthocyanin and punicalagin production. *Tree Genetics & Genomes* 2019;15:22. <https://doi.org/10.1007/s11295-019-1329-6>.
- [202] Loukhmas S, Kerak E, Elgadi S, Ettalibi F, El Antari A, Harrak H. Oil Content, Fatty Acid Composition, Physicochemical Properties, and Antioxidant Activity of Seed Oils of Ten Moroccan Pomegranate Cultivars. *Journal of Food Quality* 2021;2021:e6617863. <https://doi.org/10.1155/2021/6617863>.
- [203] Safa A, Hakimi L, Pypker TG, Khosropour E. The effect of ZnSO<sub>4</sub> and KNO<sub>3</sub> on quantitative and qualitative properties of *Punica granatum* L. *Journal of Plant Nutrition* 2020;43:1286–92. <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1729801>.
- [204] Sabraoui T, Khider T, Nasser B, Eddoha R, Moujahid A, Benbachir M, et al. Determination of Punicalagins Content, Metal Chelating, and Antioxidant Properties of Edible Pomegranate (*Punica granatum* L) Peels and Seeds Grown in Morocco. *International Journal of Food Science* 2020;2020:e8885889. <https://doi.org/10.1155/2020/8885889>.
- [205] Hernández Escarcega G, Sánchez-Chávez E, Pérez Álvarez S, Soto Caballero M, Soto Parra JM, Flores-Córdova MA, et al. Determination of antioxidant phenolic, nutritional quality and volatiles in pomegranates (*Punica granatum* L.) Cultivated in Mexico. *International Journal of Food Properties* 2020;23:979–91. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1760879>.
- [206] Schwartz E, Tzulker R, Glazer I, Bar-Ya'akov I, Wiesman Z, Tripler E, et al. Environmental conditions affect the color, taste, and antioxidant capacity of 11 pomegranate accessions' fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009;57:9197–209. <https://doi.org/10.1021/jf901466c>.
- [207] Boussaa F, Zaouay F, Burlo-Carbonell F, Noguera-Artiaga L, Carbonell-Barrachina A, Melgarejo P, et al. Growing Location Affects Physical Properties, Bioactive Compounds, and Antioxidant Activity of Pomegranate Fruit (*Punica*

*Granatum* L. Var. Gabsi). *International Journal of Fruit Science* 2020;20:508–23. <https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1741058>.

[208] Bartual J, García-González JF, Pérez-Gago MB, Parra J, Guerra D, Ortiz M, et al. Recommendations on harvesting time based on physico-chemical quality parameter changes in “Mollar de Elche” pomegranates. *Acta Horticulturae* 2019;121–8. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2019.1254.19>.

[209] Oliveira ÁMFD, Araújo RHCR, Alves K de A, Onias EA, Candeia RA, Lopes MF, et al. Composition of Fatty Acids and Antioxidant Activity of Pomegranate Seed Oil CV. ‘Molar’. *Journal of Experimental Agriculture International* 2019:1–9. <https://doi.org/10.9734/jeai/2019/v37i330267>.

[210] Munera S, Hernández F, Aleixos N, Cubero S, Blasco J. Maturity monitoring of intact fruit and arils of pomegranate cv. “Mollar de Elche” using machine vision and chemometrics. *Postharvest Biology and Technology* 2019;156:110936. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.110936>.

[211] Vardin H, Fenercioglu H. Study On The Development Of Pomegranate Juice Processing Technology; The Pressing Of Pomegranate Fruit. *Acta Horticulturae* 2009;373–82. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.818.54>.

[212] Baghel RS, Keren-Keiserman A, Ginzberg I. Metabolic changes in pomegranate fruit skin following cold storage promote chilling injury of the peel. *Scientific Reports* 2021;11:9141. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88457-4>.

[213] Aliniaiefard S, van Meeteren U. Stomata and Postharvest Physiology. In: Pareek S, editor. *Innovations in Postharvest Technology Series*, CRC Press; 2016, p. 157–216.

[214] Lufu R, Ambaw A, Opara UL. Functional characterisation of lenticels, micro-cracks, wax patterns, peel tissue fractions and water loss of pomegranate fruit (cv. Wonderful) during storage. *Postharvest Biology and Technology* 2021;178:111539. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111539>.

[215] Arendse E, Fawole OA, Magwaza LS, Nieuwoudt H, Opara UL. Evaluation of biochemical markers associated with the development of husk scald and the use of diffuse reflectance NIR spectroscopy to predict husk scald in pomegranate fruit. *Scientia Horticulturae* 2018;232:240–9. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.01.022>.

[216] Moradi S, Zamani Z, Fatahi Moghadam M-R, Koushesh Saba M. Combination effects of preharvest tree net-shading and postharvest fruit treatments with salicylic acid or hot water on attributes of pomegranate fruit. *Scientia Horticulturae* 2022;304:111257. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111257>.

[217] Koyuncu MA, Erbas D, Onursal CE, Secmen T, Guneyli A, Umzumcu SS. Postharvest treatments of salicylic acid, oxalic acid and putrescine influences bioactive compounds and quality of pomegranate during controlled atmosphere storage. *Journal of Food Science and Technology* 2019;56:350–9. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3495-1>.

- [218] Sayyari M, Valero D, Serrano M. Pre-storage salicylic acid treatment affects functional properties, unsaturated/saturated fatty acids ratio and chilling resistance of pomegranate during cold storage. *International Food Research Journal* 2017;24:637–42.
- [219] Valdenegro M, Huidobro C, Monsalve L, Bernales M, Fuentes L, Simpson R. Effects of ethrel, 1-MCP and modified atmosphere packaging on the quality of 'Wonderful' pomegranates during cold storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2018;98:4854–65. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9015>.
- [220] Mphahlele RR, Fawole OA, Makunga NP, Linus Opara U. Functional properties of pomegranate fruit parts: Influence of packaging systems and storage time. *Journal of Food Measurement and Characterization* 2017;11:2233–46. <https://doi.org/10.1007/s11694-017-9608-0>.
- [221] Mukama M, Ambaw A, Berry TM, Opara UL. Analysing the dynamics of quality loss during precooling and ambient storage of pomegranate fruit. *Journal of Food Engineering* 2019;245:166–73. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.10.020>.
- [222] Kawhena TG, Opara UL, Fawole OA. Optimization of Gum Arabic and Starch-Based Edible Coatings with Lemongrass Oil Using Response Surface Methodology for Improving Postharvest Quality of Whole "Wonderful" Pomegranate Fruit. *Coatings* 2021;11:442. <https://doi.org/10.3390/coatings11040442>.
- [223] Kashash Y, Doron-Faigenboim A, Bar-Ya'akov I, Hatib K, Beja R, Trainin T, et al. Diversity among Pomegranate Varieties in Chilling Tolerance and Transcriptome Responses to Cold Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2019;67:760–71. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06321>.
- [224] Kim HU. Lipid Metabolism in Plants. *Plants* 2020;9:871. <https://doi.org/10.3390/plants9070871>.
- [225] He M, Ding N-Z. Plant Unsaturated Fatty Acids: Multiple Roles in Stress Response. *Frontiers in Plant Science* 2020;11.
- [226] Shabtay A, Eitam H, Tadmor Y, Orlov A, Meir A, Weinberg P, et al. Nutritive and Antioxidative Potential of Fresh and Stored Pomegranate Industrial Byproduct as a Novel Beef Cattle Feed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008;56:10063–70. <https://doi.org/10.1021/jf8016095>.
- [227] Hammond ST, Brown JH, Burger JR, Flanagan TP, Fristoe TS, Mercado-Silva N, et al. Food Spoilage, Storage, and Transport: Implications for a Sustainable Future. *BioScience* 2015;65:758–68. <https://doi.org/10.1093/biosci/biv081>.
- [228] Calín-Sánchez A, Figiel A, Hernández F, Melgarejo P, Lech K, Carbonell-Barrachina AA. Chemical Composition, Antioxidant Capacity, and Sensory Quality of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Arils and Rind as Affected by Drying Method. *Food and Bioprocess Technology* 2013;6:1644–54. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0790-0>.

- [229] Hamid, Thakur NS, Thakur A, Kumar P. Effect of different drying modes on phenolics and antioxidant potential of different parts of wild pomegranate fruits. *Scientia Horticulturae* 2020;274:109656. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109656>.
- [230] John KMM, Bhagwat AA, Luthria DL. Swarm motility inhibitory and antioxidant activities of pomegranate peel processed under three drying conditions. *Food Chemistry* 2017;235:145–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.143>.
- [231] Marchi LB, Monteiro ARG, Mikcha JMG, Santos AR, Chinellato MM, Marques DR, et al. Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Capacity of Pomegranate Peel Extract (*Punica Granatum* L.) Under Different Drying Temperatures. *Chemical Engineering Transactions* 2015;44:121–6. <https://doi.org/10.3303/CET1544021>.
- [232] Mphahlele RR, Fawole OA, Makunga NP, Opara UL. Effect of drying on the bioactive compounds, antioxidant, antibacterial and antityrosinase activities of pomegranate peel. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2016;16:143. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1132-y>.
- [233] Rifna EJ, Dwivedi M. Optimization and validation of microwavevacuum drying process variables for recovery of quality attribute and phytochemical properties in pomegranate peels (*Punica granatum* L. Cv. Kabul). *Journal of Food Measurement and Characterization* 2021;15:4446–64. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01016-3>.
- [234] Elaydi K, Kamal I, Bedoui A, Allaf K. DIC texturing-assisted accelerated solvent extraction of active molecules of pomegranate peel. *Journal of Advances in Chemistry* 2016;12:4023–44. <https://doi.org/10.24297/jac.v12i9.4084>.
- [235] Kara K, Guclu BK, Baytok E, Aktug E, Oguz FK, Kamalak A, et al. Investigation in terms of digestive values, silages quality and nutrient content of the using pomegranate pomace in the ensiling of apple pomace with high moisture contents. *Journal of Applied Animal Research* 2018;46:1233–41. <https://doi.org/10.1080/09712119.2018.1490300>.
- [236] Eliyahu D, Yosef E, Weinberg ZG, Hen Y, Nikbachat M, Solomon R, et al. Composition, preservation and digestibility by sheep of wet by-products from the food industry. *Animal Feed Science and Technology* 2015;207:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2015.05.005>.
- [237] Bonazzi C, Dumoulin E. Quality Changes in Food Materials as Influenced by Drying Processes. In: Tsostas E, Mujumdar AS, editors. *Modern Drying Technology Volume 3: Product Quality and Formulation*. 1st ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.; 2011, p. 20.
- [238] Jayas DS. Food Dehydration. Reference Module in Food Science, Elsevier; 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.02913-9>.
- [239] Midilli A, Kucuk H, Yapar Z. A New Model For Single-Layer Drying. *Drying Technology* 2002;20:1503–13. <https://doi.org/10.1081/DRT-120005864>.

- [240] Doymaz İ. Experimental study on drying characteristics of pomegranate peels. *Food Science and Biotechnology* 2011;20:965–70. <https://doi.org/10.1007/s10068-011-0133-3>.
- [241] Kara C, Doymaz I. Thin Layer Drying Kinetics of By-Products from Pomegranate Juice Processing: Drying Kinetics of Pomegranate By-Products. *Journal of Food Processing and Preservation* 2015;39:480–7. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12253>.
- [242] Mphahlele RR, Pathare PB, Opara UL. Drying kinetics of pomegranate fruit peel (cv. Wonderful). *Scientific African* 2019;5:e00145. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00145>.
- [243] Lu J, Ding K, Yuan Q. One-Step Purification of Punicalagin by Preparative HPLC and Stability Study on Punicalagin. *Separation Science and Technology* 2010;46:147–54. <https://doi.org/10.1080/01496391003745710>.
- [244] Baumont R, Arrigo Y, Niderkorn V. Transformation des plantes au cours de leur conservation et conséquences sur leur valeur pour les ruminants 2011.
- [245] FAO. Silage making for smallholders 2020:20.
- [246] Pacheco MT, Villamiel M, Moreno R, Moreno FJ. Structural and Rheological Properties of Pectins Extracted from Industrial Sugar Beet By-Products. *Molecules* 2019;24:392. <https://doi.org/10.3390/molecules24030392>.
- [247] Fan Z, Chen K, Ban L, Mao Y, Hou C, Li J. Silage Fermentation: A Potential Biological Approach for the Long-Term Preservation and Recycling of Polyphenols and Terpenes in Globe Artichoke (*Cynara scolymus* L.) By-Products. *Molecules* 2020;25:3302. <https://doi.org/10.3390/molecules25143302>.
- [248] Di Cagno R, Coda R, De Angelis M, Gobbetti M. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology* 2013;33:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.09.003>.
- [249] McAllister TA, Dunière L, Drouin P, Xu S, Wang Y, Munns K, et al. Silage review: Using molecular approaches to define the microbial ecology of silage. *Journal of Dairy Science* 2018;101:4060–74. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13704>.
- [250] Capozzi V, Fragasso M, Romaniello R, Berbegal C, Russo P, Spano G. Spontaneous Food Fermentations and Potential Risks for Human Health. *Fermentation* 2017;3:49. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040049>.
- [251] Wuyts S, Van Beeck W, Oerlemans EFM, Wittouck S, Claes IJJ, De Boeck I, et al. Carrot Juice Fermentations as Man-Made Microbial Ecosystems Dominated by Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 2018;84:e00134–18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00134-18>.
- [252] Filannino P, Azzi L, Cavoski I, Vincentini O, Rizzello CG, Gobbetti M, et al. Exploitation of the health-promoting and sensory properties of organic pomegranate (*Punica granatum* L.) Juice through lactic acid fermentation. *International Journal of*

Food Microbiology 2013;163:184–92.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.002>.

[253] Han L, Zhou H. Effects of ensiling processes and antioxidants on fatty acid concentrations and compositions in corn silages. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 2013;4:48. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-48>.

[254] Arshadi M, Attard TM, Lukasik RM, Brncic M, da Costa Lopes AM, Finell M, et al. Pre-treatment and extraction techniques for recovery of added value compounds from wastes throughout the agri-food chain. *Green Chemistry* 2016;18:6160–204. <https://doi.org/10.1039/C6GC01389A>.

[255] Barba FJ, Mariutti LRB, Bragagnolo N, Mercadante AZ, Barbosa-Cánovas GV, Orlie V. Bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables after thermal and nonthermal processing. *Trends in Food Science & Technology* 2017;67:195–206. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.006>.

[256] Aggarwal S, Jain T. Modern pretreatment techniques for phytochemical extraction. *Nutrition & Food Science* 2019;49:441–54. <https://doi.org/10.1108/NFS-08-2018-0225>.

[257] Gaikwad N, Yedle V, Yenge G, suryavanshi swati, Babu D, Pal RK, et al. Effect of microwave pretreatment on extraction yield of pomegranate seed (cv. Bhagwa) oil. *International Journal of Chemical Studies* 2017;5:1291–4.

[258] Kaseke T, Opara UL, Fawole OA. Effect of Microwave Pretreatment of Seeds on the Quality and Antioxidant Capacity of Pomegranate Seed Oil. *Foods* 2020;9:1287. <https://doi.org/10.3390/foods9091287>.

[259] Yoshida T, Amakura Y, Yoshimura M. Structural Features and Biological Properties of Ellagitannins in Some Plant Families of the Order Myrtales. *International Journal of Molecular Sciences* 2010;11:79–106. <https://doi.org/10.3390/ijms11010079>.

[260] Mushtaq M, Sultana B, Anwar F, Adnan A, Rizvi SSH. Enzyme-assisted supercritical fluid extraction of phenolic antioxidants from pomegranate peel. *Journal of Supercritical Fluids* 2015;104:122–31.

[261] Qu W, Iii APB, Pan Z, Ma H, Mchugh TH. Storage Stability of Sterilized Liquid Extracts from Pomegranate Peel. *Journal of Food Science* 2012;77:C765–72. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02779.x>.

[262] Qu W, Li P, Hong J, Liu Z, Chen Y, Breksa AP, et al. Thermal stability of liquid antioxidative extracts from pomegranate peel: Sterilization and storage stability of pomegranate peel extract product. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2014;94:1005–12. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6361>.

[263] Panichayupakaranant P, Itsuriya A, Sirikatitham A. Preparation method and stability of ellagic acid-rich pomegranate fruit peel extract. *Pharmaceutical Biology* 2010;48:201–5. <https://doi.org/10.3109/13880200903078503>.

- [264] Kaderides K, Papaikonomou L, Serafim M, Goula AM. Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels: Optimization, kinetics, and comparison with ultrasounds extraction. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification* 2019;137:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2019.01.006>.
- [265] Azarpazhooh E, Sharayei P, Zomorodi S, Ramaswamy HS. Physicochemical and Phytochemical Characterization and Storage Stability of Freeze-dried Encapsulated Pomegranate Peel Anthocyanin and In Vitro Evaluation of Its Antioxidant Activity. *Food and Bioprocess Technology* 2019;12:199–210. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2195-1>.
- [266] Melo ILP de, Carvalho EBT de, Silva AM de O e, Yoshime LT, Sattler JAG, Pavan RT, et al. Characterization of constituents, quality and stability of pomegranate seed oil (*Punica granatum L.*). *Food Science and Technology* 2016;36:132–9. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.0069>.
- [267] Anwar F, Bhangar MI, Kazi TG. Relationship between rancimat and active oxygen method values at varying temperatures for several oils and fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 2003;80:151–5. <https://doi.org/10.1007/s11746-003-0668-2>.
- [268] Comunian TA, da Silva Anthero AG, Bezerra EO, Moraes ECF, Hubinger MD. Encapsulation of Pomegranate Seed Oil by Emulsification Followed by Spray Drying: Evaluation of Different Biopolymers and Their Effect on Particle Properties. *Food and Bioprocess Technology* 2020;13:53–66. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02380-1>.
- [269] Drinić Z, Mudrić J, Zdunić G, Bigović D, Menković N, Šavikin K. Effect of pomegranate peel extract on the oxidative stability of pomegranate seed oil. *Food Chemistry* 2020;333:127501. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127501>.
- [270] Hu B, Wang K, Han L, Zhou B, Yang J, Li S. Pomegranate seed oil stabilized with ovalbumin glycated by inulin: Physicochemical stability and oxidative stability. *Food Hydrocolloids* 2020;102:105602. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105602>.
- [271] Berdeaux O, Fontagné S, Sémon E, Velasco J, Sébédio JL, Dobarganes C. A detailed identification study on high-temperature degradation products of oleic and linoleic acid methyl esters by GC and GC. *Chemistry and Physics of Lipids* 2012;165:338–47. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2012.02.004>.
- [272] Tao L. Oxidation of Polyunsaturated Fatty Acids and its Impact on Food Quality and Human Health. *Advances in Food Technology and Nutritional Sciences - Open Journal* 2015;1:135–42. <https://doi.org/10.17140/AFTNSOJ-1-123>.
- [273] Vandamme T, Poncelet D, Subra-Paternault P. Microencapsulation. *Des sciences aux technologies. Tec & Doc (Ed)*. 2009.
- [274] Cam M, İçyer NC, Erdoğan F. Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *LWT - Food Science and Technology* 2014;55:117–23. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.011>.



- [275] Kaderides K, Mourtzinou I, Goula AM. Stability of pomegranate peel polyphenols encapsulated in orange juice industry by-product and their incorporation in cookies. *Food Chemistry* 2020;310:125849. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125849>.
- [276] Hamid, Thakur NS, Thakur A. Microencapsulation of wild pomegranate flavonoid phenolics by lyophilization: Effect of maltodextrin concentration, structural morphology, functional properties, elemental composition and ingredient for development of functional beverage. *LWT* 2020;133:110077. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110077>.
- [277] Rahnemoon P, Sarabi-Jamab M, Bostan A, Mansouri E. Nano-encapsulation of pomegranate (*Punica granatum L.*) Peel extract and evaluation of its antimicrobial properties on coated chicken meat. *Food Bioscience* 2021;43:101331. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101331>.
- [278] Bussolo de Souza C, Jonathan M, Isay Saad SM, Schols HA, Venema K. Characterization and in vitro digestibility of by-products from Brazilian food industry: Cassava bagasse, orange bagasse and passion fruit peel. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 2018;16:90–9. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2018.08.001>.
- [279] Sahafi SM, Goli SAH, Kadivar M, Varshosaz J, Shirvani A. Pomegranate seed oil nanoemulsion enriched by  $\alpha$ -tocopherol; the effect of environmental stresses and long-term storage on its physicochemical properties and oxidation stability. *Food Chemistry* 2021;345:128759. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128759>.
- [280] Li S, Wang K, Huang Q, Geng F. Microwave pretreatment enhanced the properties of ovalbumin-inulin-oil emulsion gels and improved the storage stability of pomegranate seed oil. *Food Hydrocolloids* 2021;113:106548. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106548>.
- [281] Goula AM, Adamopoulos KG. A method for pomegranate seed application in food industries: Seed oil encapsulation. *Food and Bioprocess Technology* 2012;90:639–52. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.06.001>.
- [282] Cortez-Trejo MC, Wall-Medrano A, Gaytán-Martínez M, Mendoza S. Microencapsulation of pomegranate seed oil using a succinylated taro starch: Characterization and bioaccessibility study. *Food Bioscience* 2021;41:100929. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100929>.
- [283] Yekdane N, Goli SAH. Effect of Pomegranate Juice on Characteristics and Oxidative Stability of Microencapsulated Pomegranate Seed Oil Using Spray Drying. *Food and Bioprocess Technology* 2019;12:1614–25. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02325-8>.
- [284] Costa AMM, Moretti LK, Simões G, Silva KA, Calado V, Tonon RV, et al. Microencapsulation of pomegranate (*Punica granatum L.*) Seed oil by complex coacervation: Development of a potential functional ingredient for food application. *LWT* 2020;131:109519. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109519>.

- [285] Comunian TA, Grassmann Roschel G, da Silva Anthero AG, de Castro IA, Dupas Hubinger M. Influence of heated, unheated whey protein isolate and its combination with modified starch on improvement of encapsulated pomegranate seed oil oxidative stability. *Food Chemistry* 2020;326:126995. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126995>.
- [286] Balli D, Cecchi L, Khatib M, Bellumori M, Cairone F, Carradori S, et al. Characterization of Arils Juice and Peel Decoction of Fifteen Varieties of *Punica granatum* L.: A Focus on Anthocyanins, Ellagitannins and Polysaccharides. *Antioxidants* 2020;9:238. <https://doi.org/10.3390/antiox9030238>.
- [287] Joly D, Brossard T, Cardot H, Cavailhes J, Hilal M, Wavresky P. Les types de climats en France, une construction spatiale. *Cybergeo: European Journal of Geography* 2010. <https://doi.org/10.4000/cybergeo.23155>.
- [288] Hernandez C, Cadenillas L, Maghubi AE, Caceres I, Durrieu V, Mathieu C, et al. Mimosa tenuiflora Aqueous Extract: Role of Condensed Tannins in Anti-Aflatoxin B1 Activity in *Aspergillus flavus*. *Toxins* 2021;13:391. <https://doi.org/10.3390/toxins13060391>.
- [289] Singleton V, Rossi J. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 1965;16:144–58.
- [290] Ribéreau-Gayon P. Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod. Paris: 1968.
- [291] RStudio Team. RStudio: Integrated development environment for r. Boston, MA: RStudio, PBC.; 2020.
- [292] R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2021.
- [293] Menyhart O, Weltz B, Györfy B. MultipleTesting.com: A tool for life science researchers for multiple hypothesis testing correction. *PLOS ONE* 2021;16:e0245824. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245824>.
- [294] Martinez-Nicolas JJ, Melgarejo P, Legua P, Garcia-Sanchez F, Hernández F. Genetic diversity of pomegranate germplasm collection from Spain determined by fruit, seed, leaf and flower characteristics. *PeerJ* 2016;4:e2214. <https://doi.org/10.7717/peerj.2214>.
- [295] Zaouay F, Mena P, Garcia-Viguera C, Mars M. Antioxidant activity and physico-chemical properties of Tunisian grown pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Industrial Crops and Products* 2012;40:81–9. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.02.045>.
- [296] Manera FJ, Legua P, Melgarejo P, Brotons JM, Hernández Fca, Martínez JJ. Determination of a colour index for fruit of pomegranate varietal group “Mollar de Elche.” *Scientia Horticulturae* 2013;150:360–4. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.11.036>.

- [297] Manera FJ, Legua P, Melgarejo P, Martínez R, Martínez JJ, Hernández Fca. Effect of air temperature on rind colour development in pomegranates. *Scientia Horticulturae* 2012;134:245–7. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.11.016>.
- [298] Manera FJ, Martínez JJ, Martínez R, Conesa A, Hernández F, Legua P, et al. La evolución del color de los frutos de granado - The evolution of pomegranate fruits colour 2010:8.
- [299] Onias EA, Araújo RHCR, Ferreira APN, De Oliveira AMF, Teodosio AEMM, Sarmiento DHA, et al. Genotype characterization of pomegranate trees grown in Tabuleiro de Russas. *Brazilian Journal of Development* 2021;7:37199–213. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n4-267>.
- [300] Surek E, Nilufer-Erdil D. Changes in phenolics and antioxidant activity at each step of processing from pomegranate into nectar. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 2014;65:194–202. <https://doi.org/10.3109/09637486.2013.854745>.
- [301] Peña ME, Artés-Hernández F, Aguayo E, Martínez-Hernández GB, Galindo A, Artés F, et al. Effect of sustained deficit irrigation on physicochemical properties, bioactive compounds and postharvest life of pomegranate fruit (cv. “Mollar de Elche”). *Postharvest Biology and Technology* 2013;86:171–80. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.06.034>.
- [302] Salman M, Ullah S, Razzaq K, Rajwana IA, Akhtar G, Faried HN, et al. Combined foliar application of calcium, zinc, boron and time influence leaf nutrient status, vegetative growth, fruit yield, fruit biochemical and anti-oxidative attributes of “Chandler” strawberry. *Journal of Plant Nutrition* 2022:1–12. <https://doi.org/10.1080/01904167.2022.2035759>.
- [303] Hegazi ES, El-Motaium RA, Yehia TA, Hashim ME. Effect of foliar boron application on boron, chlorophyll, phenol, sugars and hormones concentration of olive (*Olea Europaea* L.) Buds, leaves, and fruits. *Journal of Plant Nutrition* 2018;41:749–65. <https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1425438>.
- [304] Ranjha MMAN, Amjad S, Ashraf S, Khawar L, Safdar MN, Jabbar S, et al. Extraction of Polyphenols from Apple and Pomegranate Peels Employing Different Extraction Techniques for the Development of Functional Date Bars. *International Journal of Fruit Science* 2020;20:S1201–21. <https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1782804>.
- [305] Wang Z. Extract of Phenolics From Pomegranate Peels. *The Open Food Science Journal* 2011;5:17–25. <https://doi.org/10.2174/1874256401105010017>.
- [306] Sumaiya K, Jahurul MHA, Zzaman W. Evaluation of biochemical and bioactive properties of native and imported pomegranate (*Punica granatum* L.) Cultivars found in Bangladesh. *International Food Research Journal* 2018;25:737–46.
- [307] Tozzi F, Núñez-Gómez D, Legua P, Del Bubba M, Giordani E, Melgarejo P. Qualitative and varietal characterization of pomegranate peel: High-value co-product

or waste of production? *Scientia Horticulturae* 2022;291:110601. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110601>.

[308] Derakhshan Z, Ferrante M, Tadi M, Ansari F, Heydari A, Hosseini MS, et al. Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds. *Food and Chemical Toxicology* 2018;114:108–11. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.023>.

[309] Elfalleh W. Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. *Journal of Medicinal Plants Research* 2012;6. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.995>.

[310] Haggag MI, Elhaw MH. Estimation of some phytochemical materials and isolation of two flavonoids from pomegranate peel using different chromatographic techniques. *Materials Today: Proceedings* 2022;57:362–7. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.10.030>.

[311] Sajjad W, Sohail M, Ali B, Haq A, Hayat M, Khan I, et al. Antibacterial activity of *Punica granatum* peel extract. *Mycopath* 2015;13:105–11.

[312] Redha AAA, Hasan AM, Mandeel Q. Phytochemical Determinations of Pomegranate (*Punica granatum*) Rind and Aril Extracts and their Antioxidant, Antidiabetic and Antibacterial Activity. *Natural Products Chemistry & Research* 2018;06:1000332. <https://doi.org/10.4172/2329-6836.1000332>.

[313] Bala I, Bhardwaj V, Hariharan S, Kumar MNVR. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006;40:206–10. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.07.006>.

[314] Cao X, Wang L, Liu M, Ren X, Han T, Deng Y. Study on Solubilization and Stabilization of Eight Flavonoids by 17 Chinese Herbal Polysaccharides. *Journal of Chemistry* 2020;2020:1–10. <https://doi.org/10.1155/2020/6235284>.

[315] Harscoat-Schiavo C, Khoualdia B, Savoie R, Hobloss S, Buré C, Samia BA, et al. Extraction of phenolics from pomegranate residues: Selectivity induced by the methods. *The Journal of Supercritical Fluids* 2021;176:105300. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2021.105300>.

[316] Melgarejo-Sánchez P, Martínez JJ, Legua P, Martínez R, Hernández F, Melgarejo P. Quality, antioxidant activity and total phenols of six Spanish pomegranates clones. *Scientia Horticulturae* 2015;182:65–72. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.11.020>.

[317] Ophir R, Sherman A, Rubinstein M, Eshed R, Schwager MS, Harel-Beja R, et al. Single-Nucleotide Polymorphism Markers from De-Novo Assembly of the Pomegranate Transcriptome Reveal Germplasm Genetic Diversity. *PLOS ONE* 2014;9:e88998. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088998>.

[318] Mora J, Pott DM, Osorio S, Vallarino JG. Regulation of Plant Tannin Synthesis in Crop Species. *Frontiers in Genetics* 2022;13.

- [319] Yuan Z, Fang Y, Zhang T, Fei Z, Han F, Liu C, et al. The pomegranate (*Punica granatum* L.) Genome provides insights into fruit quality and ovule developmental biology. *Plant Biotechnology Journal* 2018;16:1363–74. <https://doi.org/10.1111/pbi.12875>.
- [320] Ono NN, Qin X, Wilson AE, Li G, Tian L. Two UGT84 Family Glycosyltransferases Catalyze a Critical Reaction of Hydrolyzable Tannin Biosynthesis in Pomegranate (*Punica granatum*). *PloS One* 2016;11:e0156319. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156319>.
- [321] Ono NN, Bandaranayake PCG, Tian L. Establishment of pomegranate (*Punica granatum*) hairy root cultures for genetic interrogation of the hydrolyzable tannin biosynthetic pathway. *Planta* 2012;236:931–41. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1706-y>.
- [322] Habashi R, Hacham Y, Dhakarey R, Matityahu I, Holland D, Tian L, et al. Elucidating the role of shikimate dehydrogenase in controlling the production of anthocyanins and hydrolysable tannins in the outer peels of pomegranate. *BMC Plant Biology* 2019;19:476. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2042-1>.
- [323] Smith HM. Constraints to obtaining consistent annual yields in perennial tree crops. I: Heavy fruit load dominates over vegetative growth. *Plant Science* 2013:10.
- [324] Cano-Lamadrid M, Galindo A, Collado-González J, Rodríguez P, Cruz ZN, Legua P, et al. Influence of deficit irrigation and crop load on the yield and fruit quality in Wonderful and Mollar de Elche pomegranates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2018;98:3098–108. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8810>.
- [325] Fattahi E, Jafari A, Fallahi E. Hand Thinning Influence on Fruit Quality Attributes of Pomegranate (*Punica granatum* L. Cv. “Malase Yazdi”). *International Journal of Fruit Science* 2020;20:S377–86. <https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1735602>.
- [326] Kołton A, Długosz-Grochowska O, Wojciechowska R, Czaja M. Biosynthesis Regulation of Folates and Phenols in Plants. *Scientia Horticulturae* 2022;291:110561. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110561>.
- [327] Lemercier B, Walter C. L'état des sols de France 2011.
- [328] Gashu K, Song C, Dubey AK, Acuña T, Sagi M, Agam N, et al. The Effect of Topo-Climate Variation on the Secondary Metabolism of Berries in White Grapevine Varieties (*Vitis vinifera*). *Frontiers in Plant Science* 2022;13:847268. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.847268>.
- [329] Pilbeam DJ, Kirkby EA. The physiological role of boron in plants. *Journal of Plant Nutrition* 1983;6:563–82. <https://doi.org/10.1080/01904168309363126>.
- [330] Liu G, Dong X, Liu L, Wu L, Peng S, Jiang C. Metabolic profiling reveals altered pattern of central metabolism in navel orange plants as a result of boron deficiency. *Physiologia Plantarum* 2015;153:513–24. <https://doi.org/10.1111/ppl.12279>.

- [331] Dong X, Liu G, Wu X, Lu X, Yan L, Muhammad R, et al. Different metabolite profile and metabolic pathway with leaves and roots in response to boron deficiency at the initial stage of citrus rootstock growth. *Plant Physiology and Biochemistry* 2016;108:121–31. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.07.007>.
- [332] Eichholz I, Huyskens-Keil S, Kroh LW, Rohn S. Phenolic compounds, pectin and antioxidant activity in blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) Influenced by boron and mulch cover. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 2011;84:26–32.
- [333] Pasković I, Soldo B, Talhaoui N, Palčić I, Brkljača M, Koprivnjak O, et al. Boron foliar application enhances oleuropein level and modulates volatile compound composition in olive leaves. *Scientia Horticulturae* 2019;257:108688. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108688>.
- [334] Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Zelko I, Lux A. Zinc in plants. *New Phytologist* 2007;173:677–702. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.01996.x>.
- [335] Ahmed R, Yusoff Abd Samad M, Uddin MdK, Quddus MdA, Hossain MAM. Recent Trends in the Foliar Spraying of Zinc Nutrient and Zinc Oxide Nanoparticles in Tomato Production. *Agronomy* 2021;11:2074. <https://doi.org/10.3390/agronomy11102074>.
- [336] Hasani M, Zamani Z, Savaghebi G, Fatahi R. Effects of zinc and manganese as foliar spray on pomegranate yield, fruit quality and leaf minerals. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 2012:0–0. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162012005000009>.
- [337] Pejam F, Ardebili ZO, Ladan-Moghadam A, Danaee E. Zinc oxide nanoparticles mediated substantial physiological and molecular changes in tomato. *PLOS ONE* 2021;16:e0248778. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248778>.
- [338] Li C, Wang L, Wu J, Blamey FPC, Wang N, Chen Y, et al. Translocation of Foliar Absorbed Zn in Sunflower (*Helianthus annuus*) Leaves. *Frontiers in Plant Science* 2022;13.
- [339] Barrameda-Medina Y, Blasco B, Lentini M, Esposito S, Baenas N, Moreno DA, et al. Zinc biofortification improves phytochemicals and amino-acidic profile in *Brassica oleracea* cv. Bronco. *Plant Science* 2017;258:45–51. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.02.004>.
- [340] Yokoyama R, de Oliveira MVV, Kleven B, Maeda HA. The entry reaction of the plant shikimate pathway is subjected to highly complex metabolite-mediated regulation. *The Plant Cell* 2021;33:671–96. <https://doi.org/10.1093/plcell/koaa042>.
- [341] Fernandez V, Brown PH. From plant surface to plant metabolism: The uncertain fate of foliar-applied nutrients. *Frontiers in Plant Science* 2013;4.
- [342] Liu C, Zhao X, Yan J, Yuan Z, Gu M. Effects of Salt Stress on Growth, Photosynthesis, and Mineral Nutrients of 18 Pomegranate (*Punica granatum*) Cultivars. *Agronomy* 2020;10:27. <https://doi.org/10.3390/agronomy10010027>.

- [343] Running M. The role of lipid posttranslational modification in plant developmental processes. *Frontiers in Plant Science* 2014;5.
- [344] He M, Qin C-X, Wang X, Ding N-Z. Plant Unsaturated Fatty Acids: Biosynthesis and Regulation. *Frontiers in Plant Science* 2020;11.
- [345] Mietkiewska E, Miles R, Wickramarathna A, Sahibollah AF, Greer MS, Chen G, et al. Combined transgenic expression of *Punica granatum* conjugase (FADX) and FAD2 desaturase in high linoleic acid *Arabidopsis thaliana* mutant leads to increased accumulation of punicic acid. *Planta* 2014;240:575–83. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2109-z>.
- [346] Hornung E, Pernstich C, Feussner I. Formation of conjugated  $\Delta 11\Delta 13$ -double bonds by  $\Delta 12$ -linoleic acid (1,4)-acyl-lipid-desaturase in pomegranate seeds. *European Journal of Biochemistry* 2002;269:4852–9. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03184.x>.
- [347] Wang J, Xu Y, Holic R, Yu X, Singer SD, Chen G. Improving the Production of Punicic Acid in Baker's Yeast by Engineering Genes in Acyl Channeling Processes and Adjusting Precursor Supply. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2021;69:9616–24. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c03256>.
- [348] Dyer JM, Chapital DC, Kuan J-CW, Mullen RT, Turner C, McKeon TA, et al. Molecular Analysis of a Bifunctional Fatty Acid Conjugase/Desaturase from Tung. Implications for the Evolution of Plant Fatty Acid Diversity. *Plant Physiology* 2002;130:2027–38. <https://doi.org/10.1104/pp.102.010835>.
- [349] Cahoon EB, Ripp KG, Hall SE, Kinney AJ. Formation of Conjugated  $\Delta 8, \Delta 10$ -Double Bonds by  $\Delta 12$ -Oleic-acid Desaturase-related Enzymes. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:2637–43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009188200>.
- [350] Qiu X, Reed DW, Hong H, MacKenzie SL, Covello PS. Identification and Analysis of a Gene from *Calendula Officinalis* Encoding a Fatty Acid Conjugase. *Plant Physiology* 2001;125:847–55. <https://doi.org/10.1104/pp.125.2.847>.
- [351] Rawat R, Yu X-H, Sweet M, Shanklin J. Conjugated Fatty Acid Synthesis: Residues 111 And 115 Influence Product Partitioning Of Momordica Charantia Conjugase \*. *Journal of Biological Chemistry* 2012;287:16230–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.325316>.
- [352] Heilmann I, Pidkowich MS, Girke T, Shanklin J. Switching desaturase enzyme specificity by alternate subcellular targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004;101:10266–71. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402200101>.
- [353] Iwabuchi M, Kohno-Murase J, Imamura J.  $\Delta 12$ -Oleate Desaturase-related Enzymes Associated with Formation of Conjugated trans- $\Delta 11$ , cis- $\Delta 13$  Double Bonds\*. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:4603–10. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210748200>.
- [354] Buček A, Vazdar M, Tupec M, Svatoš A, Pichová I. Desaturase specificity is controlled by the physicochemical properties of a single amino acid residue in the

substrate binding tunnel. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 2020;18:1202–9. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.05.011>.

[355] Cahoon EB, Carlson TJ, Ripp KG, Schweiger BJ, Cook GA, Hall SE, et al. Biosynthetic origin of conjugated double bonds: Production of fatty acid components of high-value drying oils in transgenic soybean embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999;96:12935–40. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.22.12935>.

[356] Zhang L, Wu P, Li W, Feng T, Shockey J, Chen L, et al. Triacylglycerol biosynthesis in shaded seeds of tung tree (*Vernicia fordii*) is regulated in part by Homeodomain Leucine Zipper 21. *The Plant Journal* 2021;108:1735–53. <https://doi.org/10.1111/tpj.15540>.

[357] Du W, Pan Z-Y, Hussain SB, Han Z-X, Peng S-A, Liu Y-Z. Foliar Supplied Boron Can Be Transported to Roots as a Boron-Sucrose Complex via Phloem in Citrus Trees. *Frontiers in Plant Science* 2020;11.

[358] Brown PH, Hu H. Boron Mobility and Consequent Management in Different Crops 1998;82:4.

[359] Aghdasi S, AghaAlikhani M, Modarres-Sanavy SAM, Kahrizi D. Exogenously used boron and 24-epibrassinolide improved oil quality and mitigate late-season water deficit stress in camelina. *Industrial Crops and Products* 2021;171:113885. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113885>.

[360] Vishekaii ZR, Soleimani A, Fallahi E, Ghasemnezhad M, Hasani A. The impact of foliar application of boron nano-chelated fertilizer and boric acid on fruit yield, oil content, and quality attributes in olive (*Olea europaea* L.). *Scientia Horticulturae* 2019;257:108689. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108689>.

[361] Geneste T, Faure J-D. Chapter Seven - Plant polyunsaturated fatty acids: Biological roles, regulation and biotechnological applications. In: Rébeillé F, Maréchal E, editors. *Advances in Botanical Research*, vol. 101, Academic Press; 2022, p. 253–86. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2021.09.003>.

[362] Asadpour S, Madani H, Mohammadi GN, Heravan IM, Abad HHS. Improving Maize Yield with Advancing Planting Time and Nano-Silicon Foliar Spray Alone or Combined with Zinc. *Silicon* 2022;14:201–9. <https://doi.org/10.1007/s12633-020-00815-5>.

[363] Marschner H, Marschner P, editors. *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. 3rd ed. London ; Waltham, MA: Elsevier/Academic Press; 2012.

[364] Zhang A, Chen ZY. Oxidative stability of conjugated linoleic acids relative to other polyunsaturated fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 1997;74:1611–3. <https://doi.org/10.1007/s11746-997-0086-0>.

[365] Mousavi SR, Galavi M, Rezaei M. The interaction of zinc with other elements in plants: A review 2012:5.



- [366] Yang D, Zhang H, Peng K, Chen L, He H, Huang X, et al. Differential Gene Regulation of Lipid Synthesis in the Developing Seeds of Two Biodiesel Tree Species, *Jatropha* and *Vernicia*. *International Journal of Agriculture and Biology* 2016;18:1143–52. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0218>.
- [367] Lufu R, Ambaw A, Opara UL. Water loss of fresh fruit: Influencing pre-harvest, harvest and postharvest factors. *Scientia Horticulturae* 2020;272:109519. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109519>.
- [368] Fawole OA, Opara UL. Effects of storage temperature and duration on physiological responses of pomegranate fruit. *Industrial Crops and Products* 2013;47:300–9. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.03.028>.
- [369] Mukama M, Ambaw A, Opara UL. Dynamics of pomegranate fruit weight loss during precooling and ambient storage: A spatial and temporal analysis. *Arid Zone Journal of Engineering, Technology & Environment* 2018;14:202–7.
- [370] Mahmoud GA, Mohamed GA, Botros HW, Sabri MA. Combined effect of gamma radiation, hot water and sodium bicarbonate on quality and chemical constituents of stored mandarin fruits. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 2011;44:1115–27. <https://doi.org/10.1080/03235400903024829>.
- [371] Dore A, Molinu MG, Venditti T, D’Hallewin G. Sodium Bicarbonate Induces Crystalline Wax Generation, Activates Host-Resistance, and Increases Imazalil Level in Rind Wounds of Oranges, Improving the Control of Green Mold During Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010;58:7297–304. <https://doi.org/10.1021/jf101013j>.
- [372] Sarker A, Grift TE. Bioactive properties and potential applications of Aloe vera gel edible coating on fresh and minimally processed fruits and vegetables: A review. *Journal of Food Measurement and Characterization* 2021;15:2119–34. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00802-9>.
- [373] Mohammadi L, Tanaka F, Tanaka F. Preservation of strawberry fruit with an Aloe vera gel and basil (*Ocimum basilicum*) essential oil coating at ambient temperature. *Journal of Food Processing and Preservation* 2021;45:e15836. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15836>.
- [374] Seyed R, Rastegar S, Faramarzi S. Impact of edible coating derived from a combination of Aloe vera gel, chitosan and calcium chloride on maintain the quality of mango fruit at ambient temperature. *Journal of Food Measurement and Characterization* 2021;15:1–11. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-00861-6>.
- [375] Rehman MA, Asi MR, Hameed A, Bourquin LD. Effect of Postharvest Application of Aloe Vera Gel on Shelf Life, Activities of Anti-Oxidative Enzymes, and Quality of “Gola” Guava Fruit. *Foods* 2020;9:1361. <https://doi.org/10.3390/foods9101361>.
- [376] Duguma HT. Potential applications and limitations of edible coatings for maintaining tomato quality and shelf life. *International Journal of Food Science & Technology* 2022;57:1353–66. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15407>.

- [377] Zhang Y, Zhang R. Study on the Mechanism of Browning of Pomegranate (*Punicagranafum* L. Cv. Ganesh) Peel in Different Storage Conditions. *Agricultural Sciences in China* 2008;7:65–73.
- [378] Porat R, Daus A, Weiss B, Cohen L, Droby S. Effects of combining hot water, sodium bicarbonate and biocontrol on postharvest decay of citrus fruit. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 2002;77:441–5. <https://doi.org/10.1080/14620316.2002.11511519>.
- [379] Larrigaudière C, Pons J, Torres R, Usall J. Storage performance of clementines treated with hot water, sodium carbonate and sodium bicarbonate dips. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 2002;77:314–9. <https://doi.org/10.1080/14620316.2002.11511499>.
- [380] Spadaro D, Garibaldi A, Gullino ML. Control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* on apple combining a biocontrol agent with hot water dipping and acibenzolar-S-methyl, baking soda, or ethanol application. *Postharvest Biology and Technology* 2004;33:141–51. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.02.002>.
- [381] Shimizu GD, Paula JCB de, Neves CSVJ, Pacheco C de A. Quality of pomegranate peel cultivar Valenciana as determined by different drying methods. *Revista Brasileira de Fruticultura* 2020;42:e–431. <https://doi.org/10.1590/0100-29452020431>.
- [382] Matityahu I, Glazer I, Holland D, Bar-Ya'akov I, Ben-Arie R, Amir R. Total Antioxidative Capacity and Total Phenolic Levels in Pomegranate Husks Correlate to Several Postharvest Fruit Quality Parameters. *Food and Bioprocess Technology* 2014;7:1938–49. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1184-7>.
- [383] Socas-Rodríguez B, Álvarez-Rivera G, Valdés A, Ibáñez E, Cifuentes A. Food by-products and food wastes: Are they safe enough for their valorization? *Trends in Food Science & Technology* 2021;114:133–47. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.002>.
- [384] Alp D, Bulantekin Ö. The microbiological quality of various foods dried by applying different drying methods: A review. *European Food Research and Technology* 2021;247:1333–43. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03731-z>.
- [385] Moradi A, Rahmani F, Aziz A, Qiami M. Effects of feeding pomegranate peel silage on feed intake and growth performance of Turkey bred sheep. *International Journal of Agricultural Research, Innovation and Technology* 2021;10:146–54. <https://doi.org/10.3329/ijarit.v10i2.51588>.
- [386] Kazemi M, Valizadeh R. The effect of dietary supplementation of ensiled pomegranate by-products on growth performance, nutrient digestibility, haematology parameters and meat characteristics of fat-tail lambs. *Italian Journal of Animal Science* 2021;20:1532–43. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2021.1986429>.
- [387] Ghoreishi SM, Zare AR, Rezvani MR, Zamiri MJ, Kargar S, Abarghuei MJ. Partial replacement of forage and concentrate with pomegranate pulp (peel and seed) silage and pomegranate seed pulp in Mehraban fattening lambs: Effect on performance

and carcass characteristics. *Tropical Animal Health and Production* 2021;53:486. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02901-1>.

[388] Choupani M, Riasi A, Kowsar R, Khorsandi S. Effect of pomegranate by-product silage on feed intake, blood metabolites, inflammatory responses, and prostaglandin F<sub>2α</sub> metabolites in Holstein dairy cows. *Animal Science Journal* 2020;91:e13473. <https://doi.org/10.1111/asj.13473>.

[389] Khorsandi S, Riasi A, Khorvash M, Hashemzadeh F. Nutrients digestibility, metabolic parameters and milk production in postpartum Holstein cows fed pomegranate (*Punica granatum* L.) By-products silage under heat stress condition. *Animal Feed Science and Technology* 2019;255:114213. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114213>.

[390] (*en cours de publication*) Lamotte A, Cerny M, Raynaud C, Alignan M. Changes occurring in spontaneous fermentation of pomegranate transformation byproducts: Case of pericarp phenolics and seed pomace lipids. *Food Chemistry Advances* 2023.

[391] Catania P, Comparetti A, De Pasquale C, Morello G, Vallone M. Effects of the Extraction Technology on Pomegranate Juice Quality. *Agronomy* 2020;10:1483. <https://doi.org/10.3390/agronomy10101483>.

[392] Pienaar L. The Economic Contribution of South Africa's Pomegranate Industry. Western Cape Department of Agriculture (WCDoA); 2021.

[393] Munekata PES, Domínguez R, Pateiro M, Nawaz A, Hano C, Walayat N, et al. Strategies to Increase the Value of Pomaces with Fermentation. *Fermentation* 2021;7:299. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040299>.

[394] Tan W-K, Lee S-Y, Lee W-J, Hee Y-Y, Zainal Abedin NH, Abas F, et al. Supercritical carbon dioxide extraction of pomegranate peel-seed mixture: Yield and modelling. *Journal of Food Engineering* 2021;301:110550. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110550>.

[395] Kandylis P, Kokkinomagoulos E. Food Applications and Potential Health Benefits of Pomegranate and its Derivatives. *Foods* 2020;9:122. <https://doi.org/10.3390/foods9020122>.

[396] Paul A, Radhakrishnan M. Pomegranate seed oil in food industry: Extraction, characterization, and applications. *Trends in Food Science & Technology* 2020;105:273–83. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.014>.

[397] El-Shamy S, Farag MA. Novel trends in extraction and optimization methods of bioactives recovery from pomegranate fruit biowastes: Valorization purposes for industrial applications. *Food Chemistry* 2021;365:130465. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130465>.

[398] Singh B, Singh JP, Kaur A, Singh N. Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum* L.) Peel: A review. *Food Chemistry* 2018;261:75–86. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.039>.

- [399] Natalello A, Priolo A, Valenti B, Codini M, Mattioli S, Pauselli M, et al. Dietary pomegranate by-product improves oxidative stability of lamb meat. *Meat Science* 2020;162:108037. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.108037>.
- [400] Taher-Maddah M, Maheri-Sis N, Salamatdoustnobar R, Ahmadzadeh A. Estimating fermentation characteristics and nutritive value of ensiled and dried pomegranate seeds for ruminants using in vitro gas production technique. *Open Veterinary Journal* 2012;2:40–5.
- [401] Ávila Cls, Carvalho Bf. Silage fermentation updates focusing on the performance of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology* 2020;128:966–84. <https://doi.org/10.1111/jam.14450>.
- [402] Canas S, Belchior AP, Spranger MI, Bruno-de-Sousa R. HPLC method for the quantification of phenolic acids, phenolic aldehydes, coumarins and furanic derivatives in different kinds of toasted wood used for the ageing of brandies. *Anal Methods* 2011;3:186–91. <https://doi.org/10.1039/C0AY00269K>.
- [403] ISO. International Organization for Standardization (ISO) 12966-3:2016. Animal and vegetable fats and oils Gas chromatography of fatty acid methyl esters Part 3: Preparation of methyl esters using trimethylsulfonium hydroxide (TMSH) 2016.
- [404] Agilent Technologies I. Comprehensive Analysis of FAMES, Fatty Acids, and Triglycerides 2020.
- [405] Aguilar CN, Aguilera-Carbo A, Robledo A, Ventura J, Belmares R, Martinez D, et al. Production of Antioxidant Nutraceuticals by Solid-State Cultures of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel and Creosote Bush (*Larrea tridentata*) Leaves. *Food Technology and Biotechnology* 2008;46:218–22.
- [406] Liu H-M, Xu P-F, Cheng M-Y, Lei S-N, Liu Q-L, Wang W. Optimization of Fermentation Process of Pomegranate Peel and Schisandra Chinensis and the Biological Activities of Fermentation Broth: Antioxidant Activity and Protective Effect Against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Oxidative Damage in HaCaT Cells. *Molecules* 2021;26:3432. <https://doi.org/10.3390/molecules26113432>.
- [407] Moccia F, Flores-Gallegos AC, Chávez-González ML, Sepúlveda L, Marzorati S, Verotta L, et al. Ellagic Acid Recovery by Solid State Fermentation of Pomegranate Wastes by *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*: A Comparison. *Molecules* 2019;24:3689. <https://doi.org/10.3390/molecules24203689>.
- [408] Gungor E, Altop A, Erenner G, Coskun I. Effect of raw and fermented pomegranate pomace on performance, antioxidant activity, intestinal microbiota and morphology in broiler chickens. *Archives of Animal Nutrition* 2021;75:137–52. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2021.1894065>.
- [409] Ülger I, Kaliber M, Buyukkilic Beyzi S, Konca Y. Possible ensiling of pumpkin (*Cucurbita pepo*) residues. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 2020;44:853–9. <https://doi.org/10.3906/vet-2002-81>.

- [410] Wilman D, Foulkes GR, Givens DI. The rate and extent of cell-wall degradation in vitro for 40 silages varying in composition and digestibility. *Animal Feed Science and Technology* 1996;63:111–22. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(96\)01017-6](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(96)01017-6).
- [411] Passos CP, Yilmaz S, Silva CM, Coimbra MA. Enhancement of grape seed oil extraction using a cell wall degrading enzyme cocktail. *Food Chemistry* 2009;115:48–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.064>.
- [412] Cardoso-Gutiérrez E, Narváez-López AC, Robles-Jiménez LE, Morales Osorio A, Gutierrez-Martinez M de G, Leskinen H, et al. Production Performance, Nutrient Digestibility, and Milk Composition of Dairy Ewes Supplemented with Crushed Sunflower Seeds and Sunflower Seed Silage in Corn Silage-Based Diets. *Animals* 2020;10:2354. <https://doi.org/10.3390/ani10122354>.
- [413] Mhlbauer W, Mller J. *Drying atlas drying kinetics and quality of agricultural products*. Duxford: Woodhead Publishing; 2020.
- [414] Oliveira-Alves SC, Andrade F, Prazeres I, Silva AB, Capelo J, Duarte B, et al. Impact of Drying Processes on the Nutritional Composition, Volatile Profile, Phytochemical Content and Bioactivity of *Salicornia ramosissima* J. Woods. *Antioxidants* 2021;10:1312. <https://doi.org/10.3390/antiox10081312>.
- [415] Gan C-Y, Latiff AA. Antioxidant *Parkia speciosa* pod powder as potential functional flour in food application: Physicochemical properties' characterization. *Food Hydrocolloids* 2011;25:1174–80. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.11.004>.
- [416] Putriani N, Perdana J, Meiliana, Nugrahedhi PY. Effect of Thermal Processing on Key Phytochemical Compounds in Green Leafy Vegetables: A Review. *Food Reviews International* 2020:1–29. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1745826>.
- [417] Calín-Sánchez Á, Lipan L, Cano-Lamadrid M, Kharaghani A, Masztalerz K, Carbonell-Barrachina ÁA, et al. Comparison of Traditional and Novel Drying Techniques and Its Effect on Quality of Fruits, Vegetables and Aromatic Herbs. *Foods* 2020;9:1261. <https://doi.org/10.3390/foods9091261>.
- [418] Al-Rawahi AS, Rahman MS, Guizani N, Essa MM. Chemical Composition, Water Sorption Isotherm, and Phenolic Contents in Fresh and Dried Pomegranate Peels. *Drying Technology* 2013;31:257–63. <https://doi.org/10.1080/07373937.2012.710695>.
- [419] Patrón-Vázquez J, Baas-Dzul L, Medina-Torres N, Ayora-Talavera T, Sánchez-Contreras Á, García-Cruz U, et al. The Effect of Drying Temperature on the Phenolic Content and Functional Behavior of Flours Obtained from Lemon Wastes. *Agronomy* 2019;9:474. <https://doi.org/10.3390/agronomy9090474>.
- [420] Wang R, Zhou W, Jiang X. Reaction Kinetics of Degradation and Epimerization of Epigallocatechin Gallate (EGCG) in Aqueous System over a Wide Temperature Range. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008;56:2694–701. <https://doi.org/10.1021/jf0730338>.

- [421] Lund MN. Reactions of plant polyphenols in foods: Impact of molecular structure. *Trends in Food Science & Technology* 2021;112:241–51. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.056>.
- [422] Sójka M, Janowski M, Grzelak-Błaszczak K. Stability and transformations of raspberry (*Rubus idaeus* L.) Ellagitannins in aqueous solutions. *European Food Research and Technology* 2019;245:1113–22. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3212-3>.
- [423] Rayan A, Morsy N. Thermal inactivation kinetics of peroxidase and polyphenol oxidase from pomegranate arils (*Punica granatum* L. Cv. Wonderful). *Journal of Food Biochemistry* 2020;44:e13428. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13428>.
- [424] Tuominen A, Sundman T. Stability and Oxidation Products of Hydrolysable Tannins in Basic Conditions Detected by HPLC/DAD/QTOF/MS. *Phytochemical Analysis* 2013;24:424–35. <https://doi.org/10.1002/pca.2456>.
- [425] Fawole OA, Kaseke T, Opara UL. Pomegranate Fruit Quality and Seed Drying Method: Effect on the Chemical Composition and Bioactivities of the Extracted Oil. *Processes* 2021;10:3. <https://doi.org/10.3390/pr10010003>.
- [426] Yang L, Cao Y, Chen J-N, Chen Z-Y. Oxidative Stability of Conjugated Linolenic Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009;57:4212–7. <https://doi.org/10.1021/jf900657f>.
- [427] Tsuzuki W. Cis-trans isomerization of carbon double bonds in monounsaturated triacylglycerols via generation of free radicals. *Chemistry and Physics of Lipids* 2010;163:741–5. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2010.06.006>.
- [428] Li A, Yuan B, Li W, Wang F, Ha Y. Thermally induced isomerization of linoleic acid in soybean oil. *Chemistry and Physics of Lipids* 2013;166:55–60. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2012.12.003>.
- [429] Nawar WW. Chemical changes in lipids produced by thermal processing. *Journal of Chemical Education* 1984;61:299. <https://doi.org/10.1021/ed061p299>.
- [430] Onwude DI, Hashim N, Janius RB, Nawi NM, Abdan K. Modeling the Thin-Layer Drying of Fruits and Vegetables: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2016;15:599–618. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12196>.
- [431] Page GE. Factors influencing the maximum rates of air drying shelled corn in thin layers. M.{{S}}. Purdue University, 1949.
- [432] Wang C, Singh RP. Use of variable equilibrium moisture content in modeling rice drying., 1978.
- [433] Taha E, Matthäus B. Effect of Roasting Temperature on Safflower Seeds and Oil. *Journal of Food and Dairy Science* 2018;9:103–9.
- [434] Li P, Gasmalla MAA, Zhang W, Liu J, Bing R, Yang R. Effects of roasting temperatures and grinding type on the yields of oil and protein obtained by aqueous

extraction processing. *Journal of Food Engineering* 2016;173:15–24. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.10.031>.

[435] Belcadi-Haloui R, Zekhnini A, El-Alem Y, Hatimi A. Effects of Roasting Temperature and Time on the Chemical Composition of Argan Oil. *International Journal of Food Science* 2018;2018:e7683041. <https://doi.org/10.1155/2018/7683041>.

[436] Chielle DP, Bertuol DA, Meili L, Tanabe EH, Dotto GL. Spouted bed drying of papaya seeds for oil production. *LWT - Food Science and Technology* 2016;65:852–60. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.022>.

[437] Cheng W, Liu G, Liu X. Formation of Glycidyl Fatty Acid Esters Both in Real Edible Oils during Laboratory-Scale Refining and in Chemical Model during High Temperature Exposure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2016;64:5919–27. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01520>.

[438] Kraljić K, Stjepanović T, Obranović M, Pospišil M, Balbino S, Škevin D. Influence of Conditioning Temperature on the Quality, Nutritional Properties and Volatile Profile of Virgin Rapeseed Oil. *Food Technology and Biotechnology* 2018;56:562–72. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.04.18.5738>.





---

## Résumé

---

La culture du grenadier s'intensifie depuis une décennie en Occitanie à cause de la diversification vers des cultures résilientes au changement climatique. La production française est intégralement transformée en jus, générant d'importants volumes de co-produits (60 à 70 % du fruit frais). Cette étude présente l'évolution des teneurs des principaux composés à valeur ajoutée (polyphénols, lipides) des co-produits de grenades de la parcelle à leur extraction. Le système de culture (variété, conditions pédo-climatiques et traitement foliaire), la conservation des grenades (durée, température, humidité et immersion) et le conditionnement des co-produits (séchage et ensilage) affectent les polyphénols des péricarpes, et dans une moindre mesure les lipides des co-produits de pressage des graines. La teneur en polyphénols totaux des péricarpes est plus élevée pour la variété endémique Provence (294 mg eag/g ms) que pour les autres variétés étudiées (193 mg eag/g ms). Ces composés sont préservés par une conservation des fruits adaptée à la variété et par un séchage des co-produits à 40°C, qui permet de recouvrer 99 % des polyphénols totaux et 90 % de l'ellagitannin majoritaire, la punicalagine, par rapport à la lyophilisation. En revanche, l'acide ellagique s'accumule de façon plus importante dans la variété Valenciana conservée jusqu'à 8 semaines à 17 °C et plus de 92 % d'humidité (de 5 à 14 mg/g ms) et dans les péricarpes ensilés 4 à 6 semaines (de 3 à 25 mg/g ms). La fermentation spontanée multiplie aussi par deux le rendement en huile des co-produits de pressage des graines, de 10 à 19 %. Ce procédé préserve également le profil en acides gras, dominé par l'acide punicoïque (77 à 81 %). Sa teneur relative aux autres acides gras est cependant plus élevée dans les co-produits séchés directement (78 à 81 %). La durée de ce séchage peut être diminuée sans altérer la composition lipidique de 5 h en étuve ventilée à 30 min en sécheur à tapis à 100 °C.

**Mots clefs** : grenade – co-produits – polyphénols – lipides

---

## Abstract

---

### **From field to natural ingredient: french pomegranate byproducts characterization for their valorization**

The need for crop diversification to face global climate change has led to an intensification of pomegranate cultivation in Occitanie. French pomegranate production is mainly processed into juice, generating byproducts accounting for 60-70 % of fresh fruit weight. The evolution of the contents of the main valuable compounds (phenolics and lipids), from pomegranate byproducts has been reviewed throughout this work, showing that pericarps phenolics are mainly affected by the cultural practices (variety, location and foliar treatment), the fruit conservation (temperature, humidity, treatment, and duration) and the byproduct stabilization (drying and ensiling) and seed pomace lipids to a lesser extent. The total phenolic content of pericarps was on average higher in the Provence variety (294 mg eag/g ms) than in others (193 mg eag/g ms), differing from +10 to +20% after a foliar treatment and from -30 to +30 % depending on the pedoclimatic conditions. This content was maintained by a variety-adapted fruit storage and a drying temperature of 40°C ensuring the preservation of 99 % of the total phenolic content and 90 % of the major ellagitannin's, punicalagin, as compared to freeze-drying. However, ellagic acid accumulated better in the variety Valenciana after either a 8- weeks storage at 17 °C and more than 92 % relative humidity (from 5 to 14 mg/g dw), or pericarps spontaneous fermentation for 4 to 6 weeks (from 3 to 25 mg/g dw). Spontaneous fermentation also increased the oil content by two from 10 to 19 %, while maintaining the fatty acid profile of seed pomace (punicoic acid being the predominant one with 77 to 81 % of total fatty acids). Then, seed pomace drying was reduced by 4,5 h by belt drying at 100 °C instead of oven drying, without damaging lipid content. Punicoic acid content was slightly higher (78 to 81 %) with seed pomace drying without fermentation, and minor changes (79 to 84 %) were detected with cultivation and storage of pomegranates.

**Keywords** : pomegranate – byproducts – phenolics – lipids