

**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ MOULOUD MAMMERRI DE TIZI OUZOU, ALGÉRIE
FACULTÉ DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE**



Thèse

**En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences
Biologiques; option : Biochimie Appliquée aux Bio-Industries**

Par

Hamida AKLI

Optimisation de l'obtention de produits antioxydants et évaluation de leurs activités : application aux polyphénols issus de l'extraction écologique de l'olive et des sous-produits oléicoles ainsi qu'aux protéines laitières et leurs fragments d'hydrolyse.

Devant le jury :

Président :	Mr HOUALI Karim	Professeur	UMMTO
Directeur de thèse :	Mr MATI Abderrahmane	Professeur	UMMTO
Co-Directeur de thèse :	Mr LYDAKIS-SIMANTIRIS Nikos	Professeur	Université Hellénique d'Héraklion, Grèce
Examineurs :	Mme LARDJANE Nadia	Professeur	UMMTO
	Mr AÏT OUAZZOU Abdenour	M.C.A	Université d'Alger I
	Mr TAZDAÏT Djaber	M.C.A	Université d'Alger I

Année universitaire : 2022/2023

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de participer à cette soutenance de thèse : le président Mr HOUALI Karim, Professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou ainsi que les examinateurs Mme LARDJANE Nadia, Professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Mr AÏT OUAZZOU Abdenour, Maître de conférence A., à l'Université d'Alger I et Mr TAZDAÏT Djaber, Maître de conférence A., à l'Université d'Alger I.

Je souhaite remercier particulièrement mon Directeur de thèse Mr MATI Abderrahmane, Professeur en Biochimie Appliquée à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. Merci de m'avoir accueillie au sein de votre équipe de recherche et pour m'avoir apporté et enseigné votre vision de la science et votre manière de travailler dans le laboratoire. Je suis sciencièrement reconnaissante du partage de tous les conseils précieux et enrichissants. Merci pour votre disponibilité et sagesse scientifique ainsi que pour vos aptitudes relationnelles.

J'adresse ma profonde gratitude à mon Co-Directeur de thèse, Mr LYDAKIS-SIMANTIRIS Nikos, Professeur à l'Université Héliénique d'Héraklion de Grèce. Merci pour votre engagement à collaborer avec nous. J'apprécie vos conseils critiques et constructifs ainsi que vos encouragements et orientations inestimables durant mon passage à Chania. Je vous remercie également pour votre disponibilité et soutien continus.

Je tiens à remercier scincèrement Mme LOUPASSAKI Sofia, responsable du laboratoire de l'institut Agromique de Chania, département de Qualité des Aliments et Chimie des Produits Naturels ainsi que Mr LIVIERATOS Ioannis, coordinateur du département de virologie et microbiologie des plantes, Chania, Grèce pour m'avoir accueillie et mis à ma disposition les moyens nécessaires pour mener à bien mes travaux.

Je souhaite également remercier les personnes qui ont contribué à mes travaux de recherche. Je remercie Mr GRIGORAKIS Spiros, coordinateur à l'institut Agromique de Chania, département de Qualité des Aliments et Chimie des Produits Naturels ainsi que Mr MAKRIS Dimitrios, Professeur à l'Université de Thessaly, Grèce, pour leurs conseils généreux et leurs apports considérables notamment au niveau de la quantification des composés phénoliques avec la LC-MS/MS.

J'exprime ma gratitude à Mme CANABADY-ROCHELLE Laetitia, HDR à l'Université de Lorraine, France, ainsi qu'à l'ensemble de son équipe pour avoir accepté de collaborer avec nous sur le projet de la valorisation des lactosérums.

Je remercie également tous les membres du laboratoire de Biochimie pour leur sympathie et bonne humeur. Je remercie bien évidemment Lamia, Nadia et Hassina pour leur aide technique au laboratoire ainsi que pour leur gentillesse. Aussi, merci à Assia, Dalila, Shakra, Sarah et Souad pour les échanges scientifiques et le partage d'expériences.

Enfin, je pense à ma famille qui m'a accompagnée durant mon parcours. Je pense surtout à mes parents qui m'ont suivie, motivée et surtout encouragée bien avant ma thèse et jusqu'à aujourd'hui. Sans vous, l'histoire aurait été différente et je n'en serai pas là aujourd'hui. Grâce à vous j'ai pu atteindre mes objectifs et en créer de nouveaux. Je vous remercie d'être toujours présents avec la conviction sans faille que je peux surmonter toutes les épreuves. Merci à vous!

ET MERCI A TOUS !

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES
LISTE DES ABREVIATIONS
LISTES DES FIGURES
LISTE DES TABLEAUX
RESUME

INTRODUCTION GENERALE.....	01
I/ SYNTHESE DES DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	03
Partie I : Produits oléïcoles et polyphénols.....	03
1.1.1. Production de l'huile d'olive	03
1.1.2. Principaux sous-produits oléïcoles.....	03
1.1.3. Composition des sous-produits oléïcoles et leur valorisation.....	04
1.1.4. Classes de polyphénols dans les sous-produits oléïcoles.....	04
1.1.4.1. Flavonoides.....	05
1.1.4.2. Polyphénols non flavonoides.....	06
1.1.4.3. Tannins.....	06
1.1.4.4. Lignines et lignanes.....	07
1.1.5. Polyphénols de l'huile d'olive et des sous-produits oléïcoles.....	07
1.1.6. Méthodes d'extraction des polyphénols.....	09
1.1.6.1. Extraction par champ électrique pulsé.....	10
1.1.6.2. Extraction avec décharge électrique de haute tension.....	11
1.1.6.3. Extraction par un fluide supercritique.....	12
1.1.6.4. Extraction assistée par les ultrasons.....	13
1.1.6.5. Extraction assistée par micro-ondes.....	14
1.1.6.6. Extraction à haute pression.....	14
1.1.6.7. Extraction accélérée par solvants.....	15
1.1.6.8. Extraction par chauffage ohmique pulsé.....	15
1.1.6.9. Extraction avec les solvants eutectiques profonds.....	15
1.1.7. Activités biologiques des polyphénols.....	16
1.1.7.1. Activité anti-oxydante et anti-inflammatoire.....	16
1.1.7.2. Activité anti-athérosclérotique et cardioprotective.....	16
1.1.7.3. Activité anti-tumorale, anti-proliférative, et anti-mitotique.....	17
1.1.7.4. Activité anti-microbienne et anti-virale.....	17
1.1.7.5. Activité anti-vieillessement.....	18
1.1.7.6. Autres bioactivités.....	18
1.1.8. Application industrielle des polyphénols issus des sous-produits oléïcoles.....	18
Partie II : Protéïnes du lait.....	20
1.2.1. Production du lait.....	20
1.2.2. Composition générale du lait.....	21
1.2.3. Protéïnes du lait	21
1.2.3.1. Caséïnes.....	22
1.2.3.2. Protéïnes sériques.....	22
1.2.3.2.1. Protéïnes majeures.....	23
1.2.3.2.2. Protéïnes mineures.....	25
1.2.3.3. Comparaison inter-espèce des protéïnes.....	26
1.2.4. Méthodes d'obtention des peptides bioactifs.....	28
1.2.4.1. Hydrolyse enzymatique.....	28
1.2.4.2. Fermentation microbienne.....	30
1.2.4.3. Autres méthodes	30
1.2.5. Activités biologiques des protéïnes sériques et leurs hydrolysats	31

1.2.5.1. Activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine.....	31
1.2.5.2. Activité anti-oxydante.....	32
1.2.5.3. Activité anti-diabétique.....	33
1.2.5.4. Activité de complexation de minéraux.....	34
1.2.5.5. Activité anti-microbienne.....	34
1.2.5.6. Activité opioïde.....	35
1.2.5.7. Activité immunomodulatrice.....	36
1.2.6. Application industrielle des peptides bioactifs.....	37

II/ MATERIEL & METHODES

2.1. Matériel.....	38
2.1.1. Appareillage.....	38
2.1.2. Matériel biologique.....	38
2.1.2.1. Feuilles d'olivier.....	38
2.1.2.2. Echantillons de lait	38
2.1.2.3. Enzymes et standards.....	39
2.1.3. Produits et réactifs spécifiques.....	39
2.2. Méthodes.....	39
2.2.1. Etude relative aux polyphénols issus des sous-produits oléicoles.....	39
2.2.1.1. Synthèse des solvants eutectiques profonds (DESS).....	39
2.2.1.2. Extraction des polyphénols et optimisation du processus.....	40
2.2.1.2. Détermination des polyphénols totaux	42
2.2.1.3. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).....	42
2.2.2. Etude relative aux protéines du lait.....	44
2.2.2.1. Isolement des protéines sériques totales.....	44
2.2.2.2. Dosage des protéines.....	45
2.2.2.3 Préparation des hydrolysats	45
2.2.2.4. Processus d'hydrolyse enzymatique est plans expérimentaux.....	46
2.2.2.5 Evaluation de l'activité anti-oxydante des hydrolysats (méthode CUPRAC).....	47
2.2.2.6. Degré d'hydrolyse enzymatique des hydrolysats (méthode au TNBS).....	48
2.2.2.7. Méthodes électrophorétiques	50
2.2.2.7.1. Comportement électrophorétique des protéines en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-native).....	50
2.2.2.7.2. Comportement électrophorétique des protéines en PAGE-SDS.....	50
2.2.2.8. Analyse des peptides par chromatographie liquide à haute performance en phase inversée couplée à un spectromètre de masse	51
2.2.3. Analyses statistiques.....	52

III/ RESULTATS & DISCUSSION

Chapitre I : Les sous-produits oléicoles : extraction des polyphénols par utilisation des solvants eutectiques profonds et évaluation de l'activité anti-oxydante.....	53
3.1. Synthèse des solvants eutectiques profonds (DESS).....	53
3.2. Processus d'optimisation d'extraction des polyphénols.....	54
3.2.1. Validation des modèles mathématiques	56
3.2.2. Effets des facteurs étudiés sur le rendement des polyphénols extraits.....	61

3.2.2.1. Ratio liquide/solide.....	61
3.2.2.2. Concentration de DES.....	61
3.2.2.3. Température.....	62
3.3. Evaluation de l'activité anti-oxydante des polyphénols totaux.....	64
3.4. Comparaison de l'activité anti-oxydante des sous-produits oléïques.....	65
3.5. LC-MS/MS.....	66
3.6. Conclusion.....	67
Chapitre II : Les protéines sériques du lait : isolement, caractérisation et évaluation de l'activité anti-oxydante des protéines et leurs hydrolysats	69
3.2. Isolement des protéines sériques des différentes espèces.....	69
3.2.1. Mesure du pH.	69
3.2.2. Dosage des fractions protéiques.....	69
3.2.3. Isolement des protéines sériques et analyse électrophorétique.....	70
3.2.3.1. Comportement électrophorétique en conditions non dissociantes.....	71
3.2.3.2. Comportement électrophorétique en conditions dissociantes.....	72
3.3. Processus d'optimisation de l'hydrolyse enzymatique.....	73
3.3.1. Validation des modèles mathématiques.....	75
3.3.2. Effet des facteurs étudiés sur l'hydrolyse enzymatique.....	76
3.3.2.1. Temps de sonication.....	76
3.3.2.2. Ratio enzyme/substrat.....	79
3.3.2.3. Ratio des enzymes combinées.....	80
3.4. Evaluation de l'activité anti-oxydante des hydrolysats lactosériques bovins.....	83
3.5. Comparaison de l'activité anti-oxydante des hydrolysats lactosériques des différentes espèces.....	83
3.6. Degré d'hydrolyse enzymatique.....	85
3.7. Contrôle de l'hydrolyse des protéines par électrophorèse en PAGE-SDS.....	86
3.8. Conclusion.....	93
Conclusion générale.....	94
Références bibliographiques.....	96
Annexes.....	150

LISTE DES ABREVIATIONS

a.a	Acide aminé
α -CN	Alpha caséine
α -La	Alpha Lactalbumine
ABTS	2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine
AN ₁	Teneur en azote aminé des protéines avant hydrolyse
AN ₂	Teneur en azote aminé des protéines après hydrolyse
ANOVA	Analyse de variance
ASE	Extraction accélérée par les solvants
BBD	Plan Box-Behnken
β -CN	Béta Caséine
BHA	Butyl hydroxyanisol
β -Lg	Béta Lactoglobuline
BSA	Albumine sérique bovine
C _{DES}	Concentration du solvant eutectique profond
CMP	Caséino-macropéptide
C _{TP}	Concentration en polyphénols totaux
CUPRAC	Capacité réductrice du cuivre
Cu(II)-Nc	Cuivre(II)-Néocuproïne
CV	Coefficient de variance
Da	Dalton
DES	Solvant eutectique profond
DH	Degré d'hydrolyse
DID	Dissociation de collision induite
DIOS	Désorption-ionisation sur silicium
DO	Densité optique
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
E1:E2	Ratio enzyme1:enzyme2
EC	« Enzyme commission » ou code de classification des enzymes
E:S	Enzyme:Substrat
ESI	Ionisation par électronébuliseur
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
FFD	Plan factoriel complet
FRAP	Pouvoir antioxydant de réduction du fer
GAE	Equivalent d'acide gallique
GL	Glycérol
HBA	Accepteur d'hydrogène
HBD	Donneur d'hydrogène
HDL	Lipoprotéines à haute densité
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HPP	Extraction à haute pression
HVED	Extraction avec décharge électrique de haute tension
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane
ICP	Couplage plasma inductif
IEF	Isoélectrofocalisation
IgG	Immunoglobulines G

κ -CN	Kappa-Caséine
kDa	Kilo Dalton
kV	Kilo volt
LABAB	Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies, UMMTO
Lb	Laboratoire
LC-MS/MS	Chromatographie liquide couplée à deux spectromètres de masse
LC-MS	Chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse
LDL	Lipoprotéines de faible densité
LF	Lactoferrine
Log	Logarithme décimal
LP	Lactoperoxydase
LTTM	Mélange à faible température de transition
LZ	Lysozyme
M	Molaire
MAE	Extraction assistée par micro-ondes
MALDI	Désorption-ionisation laser assistée par matrice
mA	Milliampère
MG	Matière grasse
MM	Masse molaire
μ g	Microgramme
μ L	Microlitre
μ M	Micromolaire
min	Minute
MS	Spectrométrie de masse
nm	Nanomètre
n.d	Non détecté
MPa	Méga Pascal
Npb	Teneur en azote des liaisons peptidiques des protéines
OCDE	Organisation de Coopération et du Développement Economique
OLL	Feuilles d'olivier
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OPA	O-phthaldialdehyde
PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
PDA	Détecteur à barrette de diodes
PEF	Extraction par champ électrique pulsé
pH	Potentiel d'hydrogène
pHi	pH isoélectrique
p/v	Poids/volume
PP	Protéose-peptone
PP3	Composant-3 des protéose-peptones
r^2	Coefficient de corrélation
$R_{mol}^{D/A}$ HBD:HBA	Ratio molaire donneur d'hydrogène/accepteur d'hydrogène
RMSE	Erreurs quadratiques moyennes
$R_{L/S}$	Ratio liquide/solide
ROS	Espèces réactives à l'oxygène
RP-HPLC	Chromatographie de haute performance en phase reverse
R_{PT}	Rendement en polyphénols totaux
RSM	Méthodologie de surface de reponses
SA	Albumine sérique
SDS	Dodécylsulfate de sodium

SEF	Extraction par un fluide supercritique
TEMED	N,N,N',N'-tetraméthyl-éthylène diamine
TNBS	Acide trinitrobenzène sulfonique
TTP	Teneur totale en polyphénols
Tris	Tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane
3D	Trois dimensions
UAE	Extraction assistée par les ultrasons
U/mg	Unité enzymatique/milligramme
UV	Ultra-Violet
v/v	Volume/volume
W	Watt

LISTE DES FIGURES

N°	Titre	Page
01	Production mondiale de l'huile d'olive.	03
02	Structure chimique des flavonoïdes.	05
03	Structure chimique des acides phénoliques.	06
04	Structure trans (a) et cis (b) du resvératrol.	06
05	Différentes classes des tannins.	07
06	Structure chimique de l'oleuropéine.	08
07	Mécanisme d'action du champ électrique pulsé.	10
08	Schéma du dispositif utilisant un champ électrique pulsé pour l'extraction des polyphénols.	10
09	Schéma du dispositif de l'extraction avec décharge électrique de haute tension.	11
10	Diagramme de phase (pression et température).	12
11	Schéma du dispositif de l'extraction des polyphénols assistée par les ultrasons.	13
12	Mécanisme d'action des micro-ondes dans la lyse cellulaire.	14
13	Production laitière mondiale.	20
14	Répartition de la production mondiale du lait de vache.	20
15	Production globale du lactosérum et ses utilisations.	21
16	Structure primaire de la β -lactoglobuline.	24
17	Structure primaire de l' α -lactalbumine.	24
18	Structure primaire de l'albumine sérique bovine.	25
19	Réaction d'hydrolyse des protéines.	28
20	Mécanisme catalytique des protéases.	28
21	Théorie de Linderstrøm-Lang.	29
22	Structures du donneur d'hydrogène (HBD) et des accepteurs d'hydrogènes (HBA) des DESs synthétisés.	39
23	Plan Box-Behnken pour trois facteurs.	40
24	Schéma des principales étapes suivies pour l'optimisation du rendement en polyphénols totaux.	41
25	Courbe étalon du dosage des phénols totaux en utilisant l'acide gallique comme standard.	42
26	Photographie de l'appareillage de chromatographie en phase liquide couplé à un spectromètre de masse (LC-M/MS).	43
27	Étapes d'isolement des protéines sériques et les analyses ultérieures appliquées sur cette fraction.	44
28	Courbe étalon du dosage des protéines avec la méthode de Lowry <i>et al.</i> (1950) en utilisant la BSA comme standard.	45
29	Chromophore de la réaction CUPRAC.	47
30	Courbe étalon du dosage des peptides/acide aminés antioxydants des hydrolysats en utilisant la cystéine comme standard.	48
31	Réaction de l'acide 2,4,6 trinitrobenzensulfonique avec un acide aminé.	49
32	Courbe étalon du dosage des groupements amines libres en utilisant la glycine comme standard.	49
33	Photographie de l'appareillage Orbitrap ID-X Tribrid.	52
34	Photographies des solvants eutectiques profonds (constitués de glycérol et d'arginine) prises à différents ratios molaires.	53

35	Graphiques des valeurs observées en fonction des valeurs prévues des solvants eutectiques profonds présentant quelques paramètres statistiques.	57
36	Résultats du test d'ajustement des solvants eutectiques profonds testés.	58
37	Evolution des profils prédictifs présentant la désirabilité générale des solvants eutectiques profonds avec les valeurs optimales des variables $R_{L/S}$, C_{DES} , et T .	60
38	Profils de surface en 3D présentant la variation simultanée des variables étudiées sur le rendement d'extraction avec les trois DESs.	63
39	Rendement d'extraction en polyphénols obtenus avec les solvants eutectiques profonds et les solvants conventionnels.	64
40	Relation entre teneur totale en polyphénols (TPT) et concentration en tyrosol.	67
41	Profils électrophorétiques sur gel de polyacrylamide en conditions non dissociantes des protéines solubles du différents lactosérums.	71
42	Profils électrophorétiques sur gel de polyacrylamide en PAG-SDS des protéines solubles du lactosérum des différentes espèces.	72
43	Evolution des profils prédictifs présentant la désirabilité générale des enzymes utilisées avec les valeurs optimales des variables étudiées.	78
44	Profils de surface en 3D présentant la variation simultanée des variables étudiées sur l'activité anti-oxydante.	81
45	Profils de surface en 3D présentant la variation simultanée des variables étudiés sur l'activité anti-oxydante.	82
46	Profils électrophorétiques sur gel de polyacrylamide en PAGE-SDS des hydrolysats de lactosérum des différentes espèces.	87
47	PAGE-SDS des protéines sériques du lait bovin hydrolysées avec la chymotrypsine à différents ratios avec une cinétique d'hydrolyse de 15 min à 24 h.	89
48	PAGE-SDS des protéines sériques du lait bovin hydrolysées avec la trypsine à différents ratios avec une cinétique d'hydrolyse de 15 min à 24 h.	90
49	PAGE-SDS des protéines sériques du lait bovin hydrolysées avec la pepsine à différents ratios avec une cinétique d'hydrolyse de 15 min à 24 h.	91
50	PAGE-SDS des protéines sériques du lait bovin hydrolysés par différentes enzymes avec une cinétique d'hydrolyse de 15 min à 24 h.	92

LISTE DES TABLEAUX

N°	Titre	Page
I	Composition protéique du lait bovin.	22
II	Composition de la micelle de caséine bovine.	22
III	Profil protéique du lactosérum.	23
IV	Composition générale du lait de différentes espèces.	26
V	Composition protéique du lait des différentes espèces.	27
VI	Comparaison des séquences d'acides aminés des protéines majeures du lait bovin, caprin, ovin, camelin et humain.	27
VII	Peptides antihypertenseurs identifiés dans le lactosérum.	32
VIII	Peptides antioxydants identifiés dans le lactosérum.	33
IX	Peptides antidiabétiques identifiés dans le lactosérum.	34
X	Peptides complexant les minéraux identifiés dans le lactosérum.	35
XI	Peptides antimicrobiens identifiés dans le lactosérum.	35
XII	Peptides opioïdes identifiés dans le lactosérum.	36
XIII	Peptides immunomodulateurs identifiés dans le lactosérum.	36
XIV	Valeurs des variables indépendantes utilisées dans le plan d'expérience.	41
XV	Courbes de calibration et intensités de dissociation des fragments par collisions induites.	43
XVI	Valeurs des variables indépendantes utilisées dans le plan d'expérience.	47
XVII	Rendement en polyphénols totaux avec les différents ratios en utilisant les solvants eutectiques profonds et les solvants conventionnels.	54
XVIII	Plan Box–Behnken codé et non codé avec les données observées et prédites.	55
XIX	Equations polynomiales et paramètres statistiques calculés après application du plan d'expérience.	57
XX	Conditions optimales prédites et comparaison du rendement en polyphénols entre les valeurs expérimentales et prédites des DESs testés.	59
XXI	Comparaison de l'activité anti-oxydante obtenue avec différents sous-produits oléicoles.	65
XXII	Quantification des composés phénoliques dans les extraits secs des feuilles d'olivier.	66
XXIII	pH du lait des différentes espèces.	69
XXIV	Teneurs moyennes du lait des différentes espèces.	69
XXV	Composition du lactosérum doux et acide.	70
XXVI	Plan factoriel complet codé et non-codé avec les données observées et prédites.	73
XXVII	Plan Box-Behnken codé et non-codé avec les données observées et prédites.	74
XXVIII	Equations polynomiales et quelques paramètres statistiques.	75
XXIX	Conditions optimales prédites et comparaison des valeurs CUPRAC observées et prédites.	76
XXX	Conditions optimales obtenues avec l'hydrolyse enzymatique simple et combinée des enzymes digestives.	84
XXXI	Valeurs CUPRAC des hydrolysats obtenues sous les conditions optimales de chaque modèle enzymatique.	84
XXXII	Degré d'hydrolyse des hydrolysats obtenus sous les conditions optimales de chaque modèle enzymatique.	85

Résumé

En vue de contribuer à explorer les voies de valorisation des sous-produits issus de l'obtention de l'huile d'olive et des fromages, nous avons mené des investigations pour rechercher les conditions optimales d'extraction de polyphénols issus des feuilles d'oliviers ainsi que l'évaluation de l'activité anti-oxydante de ces produits et celles des protéines de lactosérums des laits bovin, ovin, caprin et camelin.

L'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles d'olivier a été optimisée en utilisant des solvants eutectiques profonds (DESSs) à base de glycérol avec différents acides aminés (lysine, proline et arginine). Un effet significatif est observé avec tous les facteurs étudiés vis-à-vis de l'activité anti-oxydante mesurée avec le test du Folin Ciocalteu d'une part, et par la réduction du cuivre (CUPRAC) d'autre part. L'extraction des polyphénols sous les conditions optimales a abouti aux rendements d'extraction les plus importants avec les solvants eutectiques profonds où le solvant glycérol-lysine s'avère le plus performant comparé au à tous les solvants utilisés.

L'obtention des antioxydants a été optimisée en utilisant différents plans expérimentaux. C'est le cas du plan factoriel complet utilisé pour évaluer l'impact du temps de sonication et du ratio enzyme/substrat sur l'hydrolyse enzymatique des protéines sériques avec la chymotrypsine, trypsine et la pepsine. L'hydrolyse avec les combinaisons d'enzymes (pepsine-chymotrypsine, pepsine-trypsine, et chymotrypsine-trypsine) est également optimisée en appliquant le plan Box-Behnken où le temps de sonication, le ratio enzyme/substrat ainsi que la portion des enzymes ($E_1:E_2$) du ratio total enzyme/substrat ont été les variables étudiées.

L'enzymolyse sous les conditions optimales a permis d'atteindre les valeurs d'activité anti-oxydante les plus élevées avec la chymotrypsine pour les espèces bovines, caprines et ovines. Par contre, la valeur d'activité anti-oxydante la plus élevée pour l'espèce cameline est observé avec le modèle de la pepsine-chymotrypsine.

Ces résultats suggèrent la convenance des modèles chymotrypsine le cas de l'hydrolyse des protéines sériques et le glycérol-lysine pour l'extraction des polyphénols

Mots clés : sous-produits oléicoles ; polyphénols ; solvants eutectiques profonds, activité anti-oxydante ; protéines sériques du lait ; hydrolyse enzymatique, peptides bioactifs

Abstract

In order to explore the valorization ways of olive production and cheese manufacturing by-products, we have conducted an investigation which aimed at obtaining the optimal extraction and hydrolysis conditions from olive leaves and whey proteins (cow, goat, sheep and camel milk) respectively, along with the assessment of the antioxidant activity of each source.

The extraction of phenolic compounds from olive leaves was optimized using three glycerol-based deep eutectic solvents (DESs) with lysine, proline and arginine. A significant influence was observed for all the conditions studied regarding the antioxidant activity measured with Folin Ciolcalteu and cuprinc reducing antioxidant activity (CUPRAC). Polyphenols extraction under the obtained optimum conditions provided the highest total phenol yields with deep eutectic solvents where glycerol-lysine exhibited the best performance compared to all solvents used.

Antioxidants recovery from cheese industries was optimized by implementing different experimental designs. A full factorial design was used to assess the impact of sonication time and the enzyme to substrate ratio on the enzymatic hydrolysis with chymotrypsin, trypsin, and pepsin. Hydrolysis with a combination of these enzymes was also optimized by implementing a three-level-Box-Behnken design where the effects of sonication time, enzyme to substrate ratio, and the ratio of each enzyme (*E1:E2*) among the total enzyme to substrate ratio were assessed.

Enzymolysis under optimum conditions provided the highest cuprinc reducing antioxidant activity values with chymotrypsin in the case of bovine, caprine, and ovine whey proteins. However, the highest cuprinc reducing antioxidant activity value was observed with pepsin-chymotrypsin model for camel whey proteins.

These results suggest the suitability of using chymotrypsin and glycerol-lysine for an optimal antioxidant effect for whey proteins hydrolysis and polyphenols extraction, respectively.

Keywords: olive byproducts; polyphenols; deep eutectic solvents, antioxidant activity; whey proteins; enzymatic hydrolysis, biopeptides.

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les industries agroalimentaires génèrent de très grandes quantités de sous-produits à travers le monde où on estime annuellement une production à 38% de sous-produits de diverses sources. Parmi ceux d'origine animale, on retrouve les carcasses, les sabots, la peau, les os, les graisses, le sang, le lactosérum, etc. Ceux d'origine végétale incluent les épiluchures, les graines, les coquilles, les tiges, les sous-produits oléicoles (feuilles, margines, grignons), les rejets des industries sucrières, etc.

Du fait de leurs valeurs nutritionnelles appréciables, leurs fortes concentrations en composés organiques, leurs activités d'eau élevées et leurs faibles stabilités biologiques, le rejet de ces sous-produits dans l'environnement et leur décomposition microbienne causerait un déséquilibre des écosystèmes qui se manifeste sous divers effets néfastes.

Par conséquent, il devient impératif de recourir aux voies et moyens qui préservent la biodiversité tels l'enfouissement des décharges, le compostage, la digestion anaérobique, l'incinération, etc. Un autre créneau porteur a vu le jour au cours de ces dernières décennies et a consisté à exploiter les molécules bioactives contenues dans ces sous-produits. En effet, ces dernières présentent de multiples propriétés pour la santé et/ou pour la préservation des denrées alimentaires (activité anti-oxydante, antimicrobienne, anti-hypertensive, anti-thrombotique, anti-tumorale, immunomodulatrice, etc.) qui suscitent l'intérêt des industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques, notamment.

Dans cette optique, la présente étude se propose d'approcher les composés antioxydants et leurs modes d'obtention. Pour cela deux sources de produits d'antioxydants issus de l'industrie agro-alimentaire sont utilisées, à savoir les polyphénols des sous-produits oléicoles et les protéines du lactosérum du lait de différentes espèces (bovine, caprine, ovine et cameline), ainsi que leurs hydrolysats.

Il est établi par la littérature que le rendement et la composition phénolique des extraits obtenus à partir des différents sous-produits oléicoles varient en fonction de plusieurs facteurs incluant les solvants et les conditions d'extraction ainsi que la variété de la plante. Les polyphénols sont communément extraits en utilisant les solvants conventionnels. Cependant, de nouveaux solvants plus respectueux de l'environnement tels que les liquides ioniques et les solvants eutectiques profonds ont émergés. C'est notamment cette dernière option que nous avons adopté dans le cadre de cette étude, en choisissant d'extraire les polyphénols avec trois types de solvants eutectiques profonds nouvellement synthétisés, à base de glycérol et d'acides aminés.

Aux niveaux des rejets des laiteries par suite des fabrications fromagères, figure le lactosérum qui contient de grandes quantités d'eau mais aussi des protéines, du lactose, des vitamines du groupe B et des éléments minéraux.

Les protéines sériques suscitent l'intérêt des transformateurs ces dernières décennies, car, en plus de leur apport nutritionnel de premier ordre, elles sont aussi utilisées pour leurs nombreuses propriétés biologiques et fonctionnelles.

Aussi, aux fins de contribuer à la valorisation de ces coproduits d'intérêt, nous avons essayé à travers cette étude de tester leurs activités anti-oxydantes, soit à l'état native, ou en ciblant leurs produits issus de l'hydrolyse enzymatique par des protéases digestives.

Compte tenu de cet état des lieux et des problématiques émergentes qui y sont afférentes, nous nous sommes proposés d'investiguer ces deux axes de recherche avec comme objectifs d'optimiser l'extraction écologique des polyphénols issus des feuilles d'olivier, suivi de l'évaluation de l'activité anti-oxydante produite. Cette dernière est aussi mesurée dans le cadre des protéines sériques du lait de différentes espèces (bovine, caprine, ovine et cameline). Elle est comparée à celles issus des hydrolysats enzymatiques de ces protéines, réalisées avec trois enzymes digestives (trypsine, chymotrypsine et pepsine), en recourant à la méthode des surfaces de réponse, d'une part et, en maximisant l'activité anti-oxydante, d'autre part.

Pour cela, nous avons scindé nos investigations dans deux chapitres complémentaires, qui prennent en charge les aspects d'intérêt suivants :

Chapitre 1 :

- étudier l'activité anti-oxydante des extraits obtenus ;
- comparer la performance les solvants eutectiques profonds synthétisés entre eux, puis avec les solvants conventionnels ;
- obtenir des informations concernant la sélectivité des solvants eutectiques profonds ; testés envers les composés phénoliques quantifiés.

Chapitre 2 :

- étudier l'activité anti-oxydante des hydrolysats obtenus ;
- comparer le potentiel de l'activité anti-oxydante entre les différents modèles enzymatiques utilisés et déterminer le modèle le plus performant ;
- caractériser les peptides générés lors de l'hydrolyse enzymatique.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Partie I : Produits oléicoles et polyphénols

1.1.1. Production de l'huile d'olive

L'huile d'olive est une huile végétale issue du fruit de l'olivier (*Olea europaea* L.). Elle est produite par des moyens mécaniques ou chimiques. Cependant, elle est le plus souvent obtenue en utilisant des méthodes physiques telles que le broyage, la pression, la centrifugation, la filtration physique, car les méthodes chimiques affectent négativement sa qualité (Calabriso *et al.*, 2015).

Selon les données les plus récentes (2022) du Conseil Oléicole International (COI), la production mondiale de l'huile d'olive a atteint 3.01 millions de tonnes en l'an 2020/2021, avec environ 3% de plus pour l'année 2022. Il a été rapporté que 93% de la production mondiale proviendrait, d'une part, des pays de l'Union Européenne, dont l'Espagne (63% de production), l'Italie (17%), la Grèce (14%) et le Portugal (5%), d'autre part, 18 autres pays contribuent à cette production mais de façon moins importante. On retrouve dans ce lot l'Algérie, la Turquie, la Tunisie, le Maroc, etc. La figure 1 illustre la répartition de la production mondiale moyenne de l'huile d'olive de 2016 à 2021.

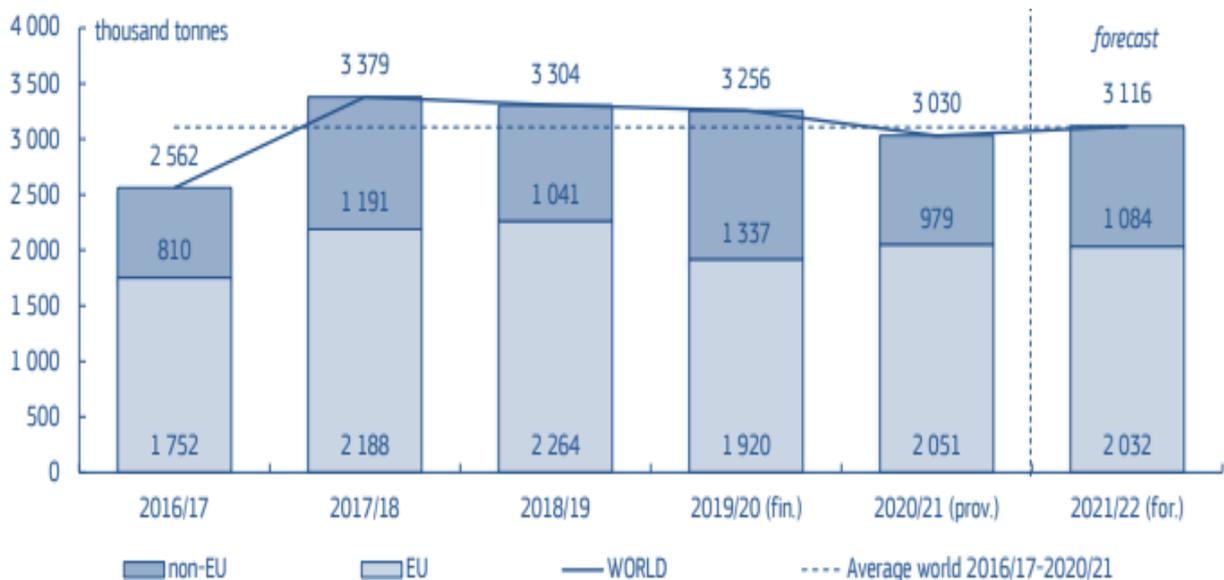


Figure 1 : Production mondiale de l'huile d'olive entre 2016 et 2021 (Anonyme 3, 2022).

1.1.2. Principaux sous-produits oléicoles

Parallèlement à la production d'huile d'olive, l'industrie oléicole mondiale génère divers résidus qui peuvent être de nature liquide (tels que les margines), ou solide (comme les grignons, les feuilles et les brindilles) (Roussos *et al.*, 2009).

L'huile d'olive est extraite en utilisant deux types de processus : un processus discontinu ou pressage traditionnel et un processus continu. Dans le premier cas, les deux phases liquides sont séparées par décantation. Le second, appelé également centrifugation, englobe deux modes de fonctionnement : le mode triphasique et biphasique. Le mode à trois phases, nécessite l'ajout d'eau et génère les grignons, l'huile d'olive et les margines. Le mode biphasique sépare l'huile des margines et des grignons. Généralement, ce dernier type nécessite l'ajout d'une faible quantité d'eau, ce qui limite le volume des margines (Rodrigues *et al.*, 2015). Il a été rapporté

que la toxicité des margines issus du système biphasique est réduite par rapport à celles produites par le système triphasique (Justino *et al.*, 2012).

D'énormes quantités de sous-produits oléicoles sont engendrés dans le monde, ce qui nuit à l'environnement, notamment au sol. A titre d'exemple, les margines sont produites annuellement à un taux de plus de 30 millions de m³ au niveau des pays méditerranéens (Doula *et al.*, 2017). La production des grignons d'olive est d'environ 2.8 millions de tonnes chaque année dans le monde avec un poids de feuilles d'olivier pouvant atteindre jusqu'à 10% des résidus (Roussos *et al.*, 2009, Tapia-Quirós *et al.*, 2022).

Les sous-produits oléicoles deviennent polluants quand ils se retrouvent déchargés anarchiquement dans les champs, les rivières, les lacs ou encore stockés/évaporés dans les lagons. Ce qui est à l'origine d'effets néfastes sur l'environnement dans les pays producteurs d'huile d'olive (Gullón *et al.*, 2010). En effet, ces décharges incontrôlées sont susceptibles de diminuer le taux de rétention et d'infiltration du sol et seraient à l'origine des effets phytotoxique et antimicrobien. De plus, l'acidité, la salinité, le cycle de l'azote, l'activité microbienne, le lessivage des sols, la concentration des lipides ainsi que celle des acides organiques et des polyphénols sont également affectés (Sierra *et al.*, 2007).

1.1.3. Composition des sous-produits oléicoles et leur valorisation

Les sous-produits oléicoles de nature solides sont composés essentiellement de lignine (31%), d'hémicellulose (24%), de cellulose (14%), de matières grasses (11%), de protéines (6%), de sucres solubles (6.5%), de phénols solubles (1.5%) et de nombreux sels minéraux (6% de la matière sèche) (Alburquerque *et al.*, 2004). Les grignons d'olive sont des sous-produits solides essentiellement ligno-cellulosiques contenant la pulpe d'olive et le bois, mais aussi la matière grasse, les sucres, les acides aminés, les polyphénols et les sels minéraux (Nunes *et al.*, 2018).

Les margines contiennent deux fractions, l'une insoluble (constituée essentiellement de pulpes d'olives (matière organique, 64.6%) et l'autre soluble, contenant des sucres (12%), des lipides (4.2%), des sels minéraux (7.2%) et des composés phénoliques (2.2%).

Les feuilles d'olivier fraîches sont constituées de 50% d'eau et une teneur variable en d'autres constituants (protéines, lipides, minéraux, carbohydrates, fibres, cellulose, hémicellulose, lignines, et polyphénols). Les variations observées dépendent d'un certain nombre de facteurs dont la variété, les conditions climatiques, la période de prélèvement et l'âge des plantations (Nefzaoui, 1985). En raison de leur toxicité sur l'environnement, les sous-produits oléicoles sont valorisés à travers différentes approches et par des utilisations variées (alimentation animale, compostage, ensilage, etc.). Cependant, la tendance actuelle vise à récupérer les molécules bioactives contenues dans ces résidus et orienter par la suite ces sous-produits vers d'autres traitements avant utilisation.

1.1.4. Classes de polyphénols dans les sous-produits oléicoles

Les polyphénols sont les produits du métabolisme secondaire des plantes. La synthèse de ces composés provient des voies shikimate et acétate au cours du développement normal des plantes sous les différentes conditions de stress (Naczek *et Shahidi*, 2004). Les polyphénols sont largement présents dans les aliments (fruits, légumes, céréales, olives, les graines et le chocolat,

etc.) et boissons (thé, café, bière, vin, etc.). Ces molécules sont en partie responsables des propriétés organoleptiques des aliments (Cieslik *et al.*, 2006).

Bien qu'il ne soit pas bien défini, le rôle biologique des polyphénols semble être lié à certains mécanismes de défense contre les agents pathogènes, les agents herbivores, les insectes et les radiations ultraviolettes. Plus de 8000 différentes structures ont été identifiées, dont les molécules simples (telles que les acides phénoliques) et les molécules plus complexes (comme par exemple les tannins). Les polyphénols sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau aromatique qui possède un ou plus groupements hydroxyles. Les polyphénols peuvent être classés selon leurs structures chimiques en flavonoïdes, non-flavonoïdes, tannins, lignanes et lignines (Quideau *et al.*, 2011).

1.4.1.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent le groupe le plus important des polyphénols, avec plus de 5000 composés décrits (Bravo, 1998). Leurs structures chimiques sont caractérisées par la présence de deux noyaux aromatiques liés par trois carbones qui forment généralement un hétérocycle oxygéné. Cette classe de polyphénols est subdivisée en plusieurs sous-groupes à savoir : les flavones, les flavonoles, les flavanones, les isoflavones et anthocyanidines (Frutos *et al.*, 2004) (Figure 2). La diversité des flavonoïdes est due à la multitude des modèles de substitution des groupements hydroxyles, méthoxyles et glycosyls qui peuvent être remplacés et donner naissance à une nouvelle molécule plus complexe. Cette subdivision est basée, d'une part, sur le degré l'hydroxylation et de liaison du noyau aromatique au noyau hétérocyclique, et, d'autre part, sur le nombre et la nature des substituants (Girotti-Chanu, 2006).

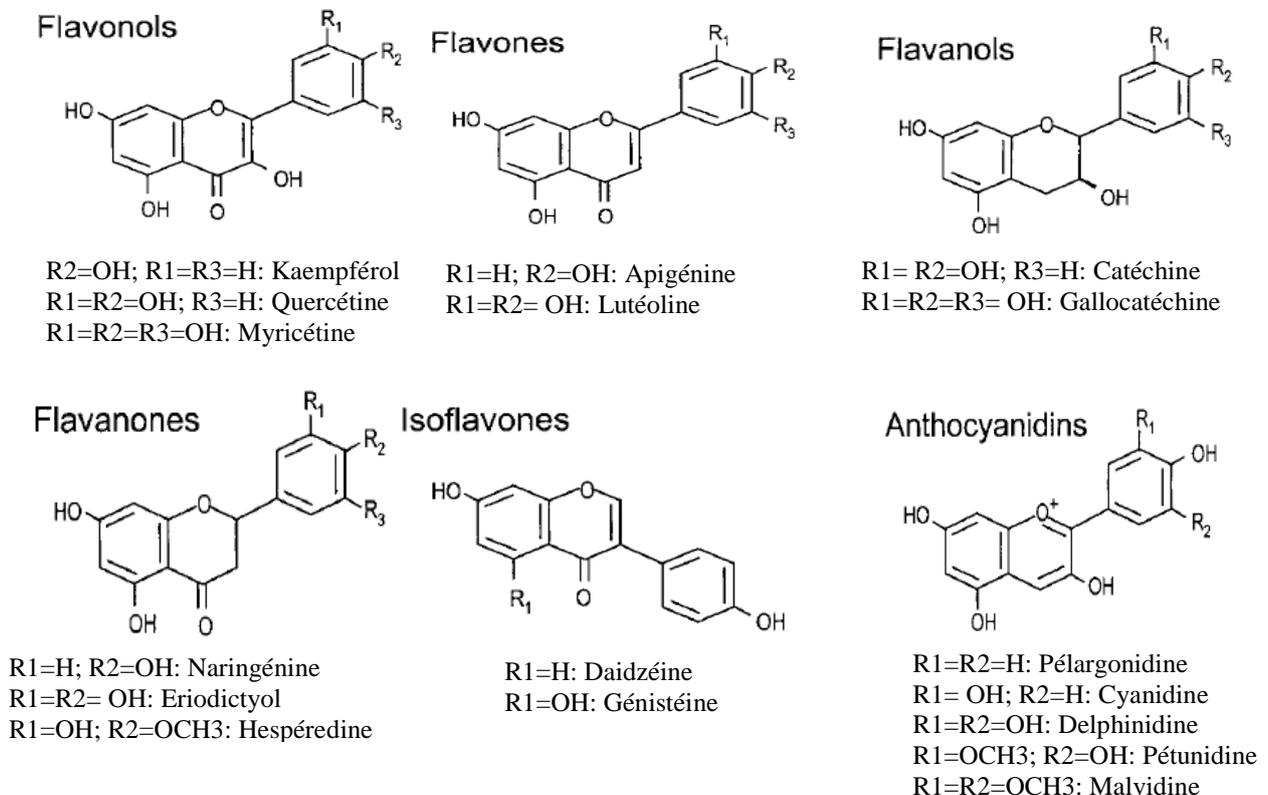
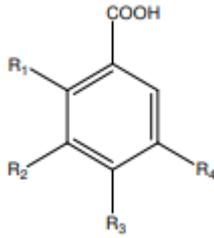


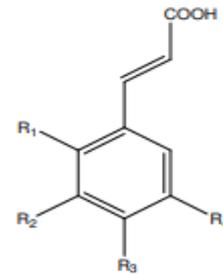
Figure 2: Structure chimique des flavonoïdes (Manach *et al.*, 2004).

1.1.4.2. Polyphénols non-flavonoïdes

Parmi les structures de polyphénols non-flavonoïdes les plus communes, on retrouve les acides phénoliques et les stilbènes. Les acides phénoliques sont composés des acides hydroxybenzoïques et des acides hydroxycinnamiques (Figure 3) (Priscilla et da Silva, 2021).



Acide hydroxybenzoïque



Acide hydroxycinnamique

R1=H, R2=R3=R4=OH: acide gallique
 R1=R4=OH, R2=R3=OH: acide gentisique
 R1=OH, R2=R3=R4=H: acide salique
 R1=R2=R4=H, R3=OH: acide benzoïque
 R1=R4=H, R2=R3=OH: acide syringique
 R1=R4=H, R3=OH; R2=OCH3: acide vanillique

R1=R2=R4=H, R3=OH: acide p-coumarique
 R1=R4=H, R2=R3=OH: acide caféique
 R1=R4=H, R3=OCH3, R2=OH: acide férulique
 R1= HOCH3, R2=R4=OH, R3= OCH3: acide sinapique

Figure 3 : Structure chimique des acides phénoliques (Dicko *et al.*, 2006).

La structure chimique des stilbènes est caractérisée par son noyau 1,2 diphenyléthylène avec les substituants hydroxyles sur le noyau aromatique. Les stilbènes peuvent être monomériques ou oligomériques. Le resvératrol est le composé le plus étudié de cette classe (Figure 4) (Roupe *et al.*, 2006).

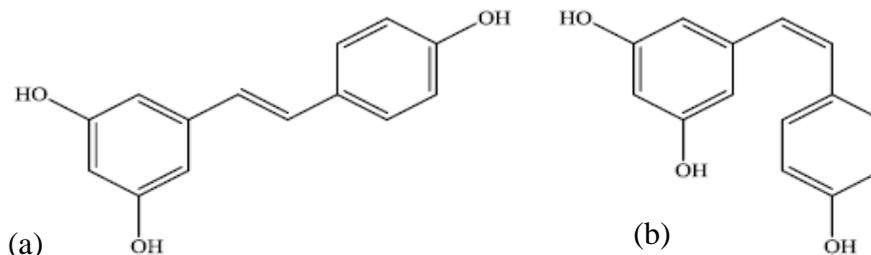


Figure 4 : Structure trans (a) et cis (b) du resvératrol (Gambini *et al.*, 2015).

1.1.4.3. Tannins

Les tannins sont subdivisés en deux groupes hydrolysable et condensé (Figure 5). Les tannins hydrolysables peuvent être hydrolysés chimiquement ou enzymatiquement. Ils consistent en un hydrate de carbone (principalement en glucose) dont les groupements hydroxyles sont estérifiés avec des acides phénoliques (galliques, hexahydroxydiphénique). Les tannins condensés sont des polymères de flavan-3-ol (dimères, trimères, tétramères, mais aussi des structures hautement polymérisées) qui sont également appelés proanthocianidines (Xie et Dixon, 2005). Ces molécules hautement hydroxylées peuvent former des complexes insolubles

consistant en hydrates de carbones et de protéines. Ces composés sont à l'origine de l'astringence de certains aliments due à la précipitation des protéines salivaires (Cosme *et al.*, 2008).

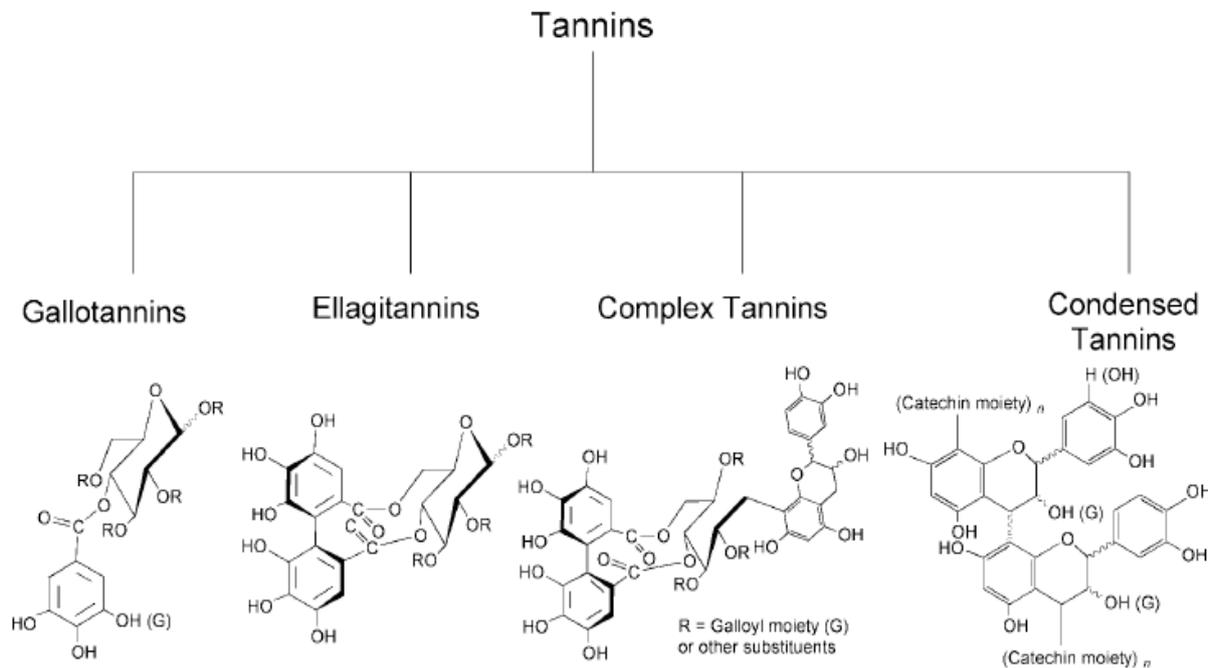


Figure 5 : Différentes classes des tannins (Khanbabee et Van Ree, 2001).

1.1.4.4. Lignanes et lignines

Les lignanes sont formés par la condensation de deux molécules phénoliques monolignoliques telles que l'alcool coniférylique. Ils peuvent aussi provenir de diverses oxydations, réductions et alkylations au niveau des plantes (secoisolaricirésinol, pinorésinol, matairesinol) (Aura *et al.*, 2005).

Les lignines sont formées par la polymérisation de trois monolignols à savoir le coumaryl, le coniféryl et les alcools sinapyl (Begum *et al.*, 2004). Il existe diverses lignines qui présentent des différences au niveau de leurs masses et leur contenu méthoxyl. Elles assurent une fonction de support et d'imperméabilité dans le tissu vasculaire et jouent un rôle de défense contre les pathogènes, insectes et herbivores (Ryan *et al.*, 2002).

1.1.5. Polyphénols de l'huile d'olive et des sous-produits oléicoles

Il a été rapporté que les principaux polyphénols de l'huile d'olive appartenaient aux groupes des sécoiridoïdes, flavonoïdes, alcools phényliques, lignanes et acides phénoliques. Cependant, le profil phénolique varie en fonction des facteurs environnementaux et agronomiques tels que la variété, la saison, la région géographique, l'irrigation et la température (Bendini *et al.*, 2007; Pérez-Trujillo *et al.*, 2010).

Les sécoiridoïdes représentent un groupe de composés existant dans toutes les espèces des oleaceae à savoir l'olivier (*Olea europaea* L.). Ils regroupent la majorité des polyphénols bioactifs présents dans l'huile d'olive et des drupes. La plupart des dérivés phénoliques des

sécoiridoïdes proviennent de l'oleuropéine et du ligstroside qui représentent les principaux sécoiridoïdes du fruit de l'olivier (Tylewicz *et al.*, 2018).

La principale structure des sécoiridoïdes est formée par un alcool phényléthylique (hydroxytyrosol ou tyrosol), l'acide élénolique (EA) et un résidu glucosidique. L'oleuropéine est un ester de l'hydroxytyrosol (3,4-DHPEA) et de l'acide élénolique glucoside (Figure 6). Par contre, le ligstroside est un ester de tyrosol et de l'acide élénolique glucoside (p-HPEA). En outre, on retrouve également d'autres sécoiridoïdes dans l'huile d'olive notamment la forme dialdéhydrique de l'acide élénolique lié à l'hydroxytyrosol ou le tyrosol (3,4-DHPEA-EDA et p-HPEA-EDA) (Ricciutelli *et al.*, 2017).

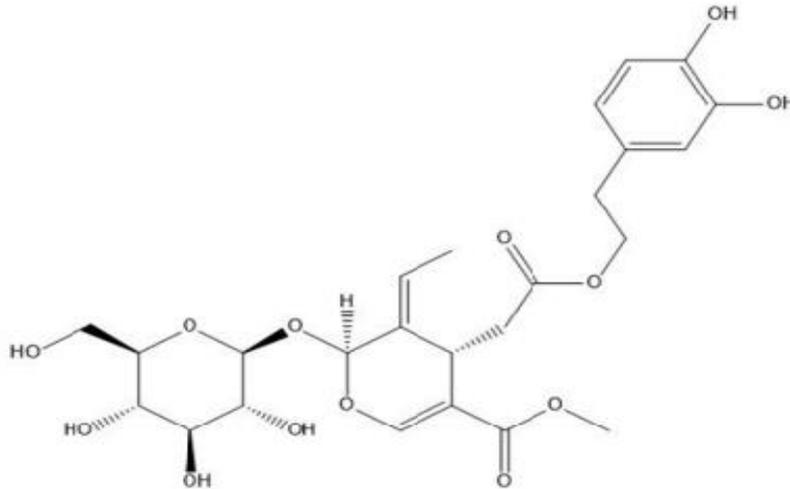


Figure 6 : Structure chimique de l'oleuropéine (Şahin et Bilgin, 2017).

Les alcools phénoliques de l'huile d'olive sont le tyrosol et l'hydroxytyrosol. Leurs concentrations augmentent au cours du processus d'hydrolyse survenant durant l'oxydation de l'huile d'olive (Tsimidou, 1998).

Les acides phénoliques sont présents dans l'huile d'olive à de faibles concentrations (<1 mg kg⁻¹ d'huile d'olive). A titre d'exemple, on peut citer l'acide protocatéchique, gallique, vanillique, caféique, p-hydroxybenzoïque, syringique, p- et o-coumarique, férulique, et l'acide cinnamique (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006; Franco *et al.*, 2014).

Les lignanes trouvées dans l'huile d'olive sont le (+)-pinorésinol et le 1-acétoxypinorésinol. Ce dernier est particulièrement présent dans les olives (López-Biedma *et al.*, 2016)

Les flavonoides qui sont généralement présents dans l'huile d'olive sont la lutéoline et l'apigénine avec une concentration oscillante entre 0.2 à 10 mg kg⁻¹ (Kelebek *et al.*, 2017).

Par ailleurs, les feuilles d'olivier contiennent aussi différents groupes de composés phénoliques représentés par les phénols simples, les sécoiridoïdes et les flavonoides. La différence majeure entre l'huile d'olive et les feuilles d'olivier au niveau composition est que l'oleuropéine, le ligstroside et divers flavonoides sont présents dans leur forme glycosylée (lutéoline-7-O-rutinoside, lutéoline-5-O-glucoside, quercétine-7-O-rutinoside, etc.) (Talhoui *et al.*, 2015). Les sécoiridoïdes sont les principaux polyphénols des feuilles d'olivier et

l'oleuropéine est le composé majeur de la fraction phénolique, avec une concentration qui varie entre 24.7 et $143.2 \times 10^3 \text{ mg kg}^{-1}$ de masse des feuilles sèches (Talhaoui *et al.*, 2014). La concentration totale des composés phénoliques des feuilles d'olivier est hautement supérieure à celle trouvée dans l'huile d'olive. Il est rapporté une concentration de 10000–82000 mg kg^{-1} pour les feuilles d'olivier (Talhaoui *et al.*, 2015b) versus 40–1000 mg kg^{-1} l'huile d'olive (Bajoub *et al.*, 2017).

Les principaux composés phénoliques des margines sont les acides benzoïques et leurs dérivés (l'acide 4-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique), l'acide hydroxycinnamique et leurs dérivés (l'acide férulique et caféique) et les dérivés des sécoiridoïdes (tyrosol et hydroxytyrosol). La concentration de l'hydroxytyrosol dans les margines est élevée par rapport à celle trouvée dans l'huile d'olive et les autres sous-produits oléicoles. Cette différence est due à l'hydrolyse de l'oleuropéine sous l'action de l'estérase pendant l'extraction de l'huile d'olive (Benincasa *et al.*, 2022).

Les composés phénoliques les plus concentrés dans les grignons sont l'hydroxytyrosol, le tyrosol et l'acide élénolique ainsi que leurs dérivés formés lors de l'oxydation, l'hydrolyse, etc. La concentration de l'oleuropéine et ses dérivés dans les grignons est très faible (Rubio-Senent *et al.* 2012, 2013).

1.1.6. Méthodes d'extraction des polyphénols

L'extraction est la première étape et la plus importante dans le processus d'isolement et de valorisation des composés d'intérêt aux niveaux des sous-produits oléicoles. Bien qu'il existe plusieurs méthodes, il n'y a pas une qui soit standard pour l'extraction des polyphénols. Globalement, ces méthodes peuvent être subdivisées en deux catégories : celles conventionnelles et celles non conventionnelles.

Les méthodes dites conventionnelles telles que la macération, l'extraction au soxhlet, l'extraction à reflux, etc. ont été utilisées pendant longtemps. Ces méthodes sont généralement fastidieuses et demandent une haute qualité de solvants, ce qui fait qu'elles sont peu avantageuses pour les objectifs économiques (Wang et Weller, 2006). De plus, l'utilisation de l'ébullition lors de l'extraction peut conduire à la perte des polyphénols (Fontana *et al.*, 2013).

En raison de ces inconvénients, il a été rendu nécessaire de développer de nouvelles approches contenues dans l'appellation de « méthodes d'extraction non conventionnelles », qui s'appuient sur des techniques telles que la méthode d'extraction par champ électrique pulsé, l'extraction par un fluide supercritique, l'extraction assistée par micro-ondes, l'extraction assistée par ultrasons, l'extraction accélérée par solvants, etc. Ces méthodes sont relativement rapides, exigent peu de solvants, sont plus faciles à mettre en œuvre et sont soucieuses, dans une certaine mesure, de la préservation de l'environnement (Tatke et Rajan, 2014).

Du fait de leur pertinence et des résultats probants qu'on y obtient en ayant recours à ces méthodes relativement récentes, il nous a semblé utile de donner un aperçu ci-après de leurs principes et des moyens opératoires qu'elles mettent en œuvre.

1.1.6.1. Extraction par champ électrique pulsé (PEF)

La méthode d'extraction par Champ Electrique Pulsé (PEF) est un processus non thermique qui s'opère avec de courtes impulsions électriques. Ces impulsions permettent de désintégrer les cellules, ce qui conduit à la libération des composés d'intérêt. Les matrices à traiter sont placées entre deux électrodes. Le principe de la PEF réside en l'électroporation de la membrane cellulaire. La formation des pores est initiée, car le potentiel transmembranaire de la membrane augmente à l'exposition au champ électrique (Figure 7) (Yammine *et al.*, 2018).

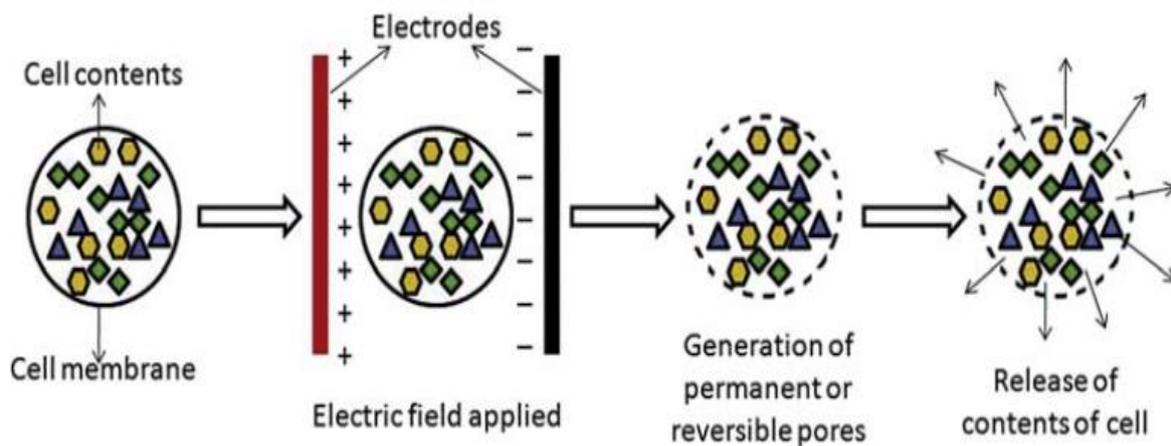


Figure 7 : Mécanisme d'action du champ électrique pulsé (Kumari *et al.*, 2017).

La figure 8 montre les parties de base de la PEF. Il existe trois principales parties dans le système d'extraction : (1) une source de courant haute tension pour générer l'impulsion, (2) une chambre de traitement et (3) un système de contrôle des paramètres du processus.

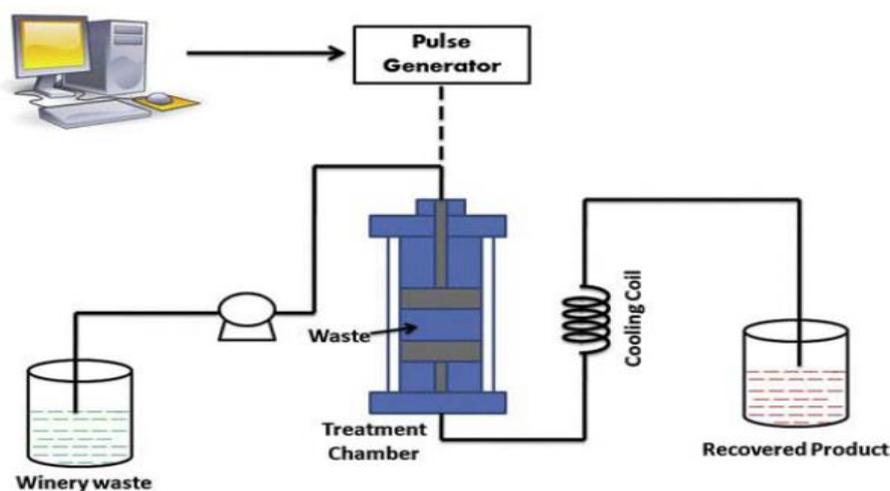


Figure 8 : Schéma du dispositif utilisant un champ électrique pulsé pour l'extraction des polyphénols (Lasekan *et al.*, 2016).

Les paramètres du processus incluent l'intensité des impulsions, le temps d'exposition, la vitesse de pompage des sous-produits et le contrôle de la température. La source du courant

est munie d'un dispositif pour convertir le courant alternatif (AC) en un courant continu (DC). Les sous-produits sont pompés dans la chambre de traitement qui est placée entre un ensemble d'électrodes d'une manière contrôlée. Une fois à l'intérieur de la chambre de traitement, les sous-produits sont traités avec des impulsions électriques de haute tension pendant une période déterminée afin de libérer le composé d'intérêt. Ce composé est ensuite pompé vers un autre compartiment.

En raison de l'application du haut voltage, un effet ohmique du chauffage de l'échantillon est noté. Ce qui n'est pas convenable si le composé d'intérêt est thermolabile. D'où l'intérêt de la présence d'un système de refroidissement pour réduire cet effet. La PEF est utilisée avec succès après la macération afin d'augmenter la teneur en polyphénols (Donsí *et al.*, 2011). Une augmentation de la teneur totale en polyphénols a été observée lors de l'utilisation des pelures de raisin extraits avec la PEF (Takaki *et al.*, 2011). Le rendement a augmenté de 16 à 84.2% quand le voltage s'élève de 30 à 60 kV (Boussetta *et al.*, 2012).

1.1.6.2. Extraction avec décharge électrique de haute tension (HVED)

L'extraction avec décharge électrique de haute tension (HVED) applique une tension haute (jusqu'à 40 kV) et un courant (jusqu'à 10 kV) depuis l'électrode jusqu'à la phase liquide. Ceci entraîne l'excitation des électrons des molécules d'eau à un niveau supérieur et conduit à la génération d'un flux d'électrons, c'est la phase de pré-dégradation. Cette phase est suivie d'une phase de dégradation où les électrons générés approchent l'électrode négative. Lors de la dégradation, d'autres phénomènes se produisent tels que la cavitation des bulles, les ondes de choc de haute amplitude, la turbulence liquide et la production des espèces réactives. La production des ondes de choc se produit lorsque l'eau résiste à l'expansion de la pression de courte durée qui se forme au début de la décharge. La décharge générée entraîne aussi la formation des canaux plasmatiques, qui en combinaison avec les rayonnements UV conduit à de hautes températures (Figure 9).

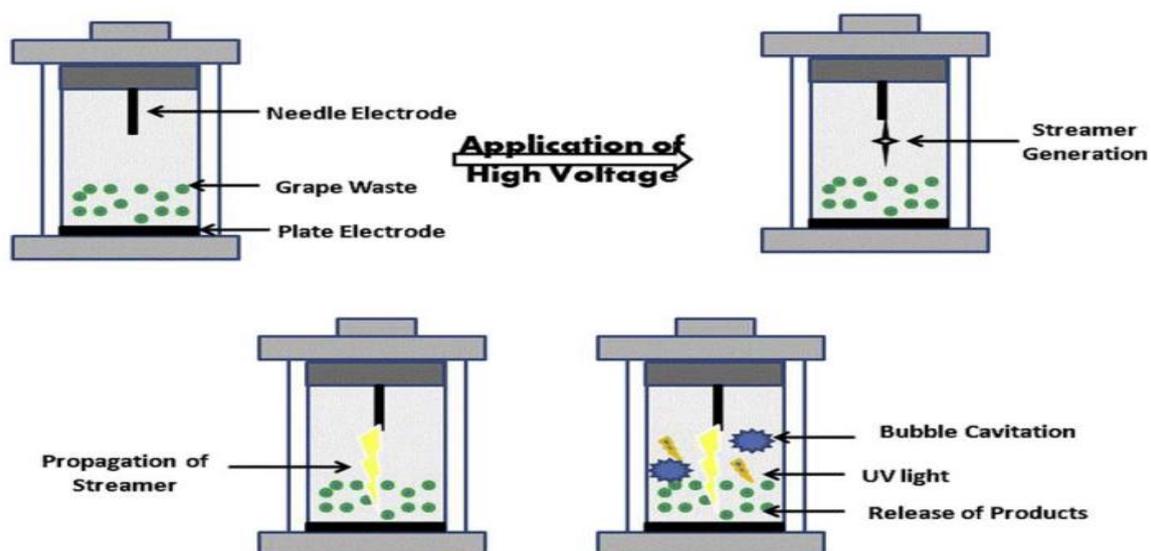


Figure 9 : Schéma du dispositif de l'extraction avec décharge électrique de haute tension (Carciochi *et al.*, 2017).

Tous les phénomènes secondaires au niveau macroscopique conduisent à la fragmentation des cellules et à l'extraction du composé d'intérêt. La distance de l'électrode est un paramètre important dans l'efficacité de la méthode HVED. Il doit être optimisé avec les autres facteurs, à savoir l'apport de l'énergie, la composition du solvant, et le ratio liquide-solide (Boussetta *et al.*, 2011). Les extraits obtenus avec le traitement en utilisant la méthode HVED sur les pépins de raisin peuvent être concentrés avec l'aide de la filtration membranaire (Liu *et al.*, 2011). La méthode HVED a prouvé son efficacité avec un temps d'utilisation réduit par rapport à la PEF, 60 min et 180 min respectivement (Boussetta *et al.*, 2009). Entre la HVED, PEF et l'ultrasonication, c'est la méthode HVED qui a montré le plus d'altération tissulaire et le rendement le plus élevé en polyphénols et en protéines avec les sous-produits du vignole (Rajha *et al.*, 2014).

1.1.6.3. Extraction par un fluide supercritique (SEF)

L'extraction par un fluide supercritique (SEF) est une technique récente pour extraire les composés phénoliques. Elle utilise un fluide supercritique ayant une température et une pression au-dessus de celle du solvant d'extraction. Au-dessus du point critique, le fluide change de propriétés (Figure 10). Il devient similaire au gaz avec sa faible viscosité, diffusivité élevée, sa tension de surface marginale et son pouvoir de solvation élevé. Ces propriétés permettent une meilleure pénétration de la matrice et une extraction efficace.

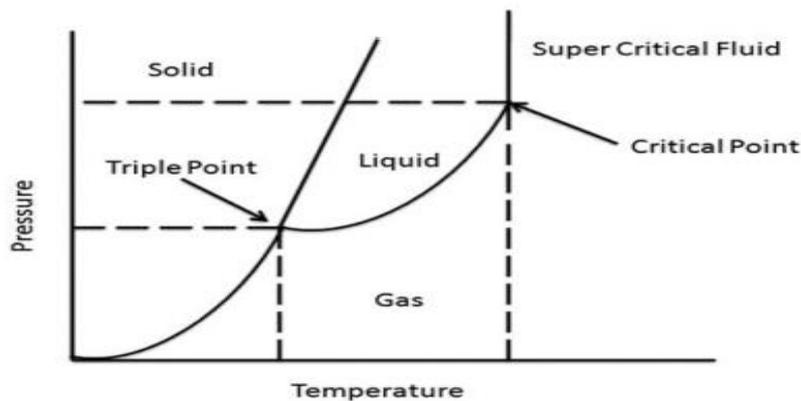


Figure 10 : Diagramme de phase (pression et température) (Gogoi et Kakoty, 2017).

Le fluide supercritique le plus utilisé est le CO₂ (SC-CO₂) en raison de sa non toxicité et de sa non-inflammabilité (température et pression critiques respectives de 31.1°C et 7.4 MPa). Il est utilisé pour extraire des composés thermolabiles (application de températures modérées) et des analytes non polaires (étant donné qu'il est un solvant non polaire). Pour l'extraction d'analytes polaires, il y a lieu de rajouter des co-solvants (éthanol, acétone ou méthanol, notamment). Ces derniers augmentent le pouvoir de solvation et aident à solubiliser et à extraire les analytes polaires. L'éthanol est communément utilisé, en raison de sa grande disponibilité, sa facilité à l'élimination et son acceptation dans l'industrie agroalimentaire. La température critique du mélange éthanol SC-CO₂ se situe dans l'intervalle favorable allant de 40 à 60°C.

En général, le processus d'extraction se déroule en deux étapes : le liquide supercritique pénètre d'abord la matrice et entraîne la dilatation de la structure cellulaire, ensuite une dissolution du produit à extraire est observée. Le produit en surface est à la fin séparé du solvant supercritique.

La pression, la température et le co-solvant jouent un rôle important dans l'extraction du resvératrol à partir des graines, des branches, des pelures et du marc de raisin en utilisant le SC-CO₂ (Casas *et al.*, 2010). L'extraction du squalène, composés cosmétique de valeur, est avantageuse avec la SFE car l'oxydation des composés est absente ce qui évite ainsi la dégradation du celui-ci (Naziri *et al.*, 2016).

1.1.6.4. Extraction assistée par les ultrasons (UAE)

L'extraction assistée par les ultrasons (UAE) est la technique la plus communément utilisée pour l'obtention des polyphénols. Elle peut être utilisée seule ou comme étape de prétraitement afin d'améliorer l'efficacité du processus d'extraction. Elle fonctionne sur la base du phénomène de cavitation. Les ondes d'ultrasons produisent de l'énergie qui est transférée dans le milieu liquide en question. Ceci conduit à la génération des cycles de compression et de raréfaction ou expansion. Le cycle de haute pression (appelé compression) est suivi par le cycle de la pression basse (ou expansion).

La formation de la cavitation des bulles se produit durant le cycle d'expansion où les bulles prennent plus de taille. Après avoir atteint un certain volume où les bulles ne peuvent pas absorber l'énergie, la compression se déclenche et un effondrement (sous le nom de cavitation) prend place (Figure 11) où la température et la pression atteignent jusqu'à 5000°K et 2000 atm, respectivement. Ceci produit des micro-jets envers les cellules. Tous ces facteurs conduisent à la destruction des membranes cellulaires et facilitent l'extraction.

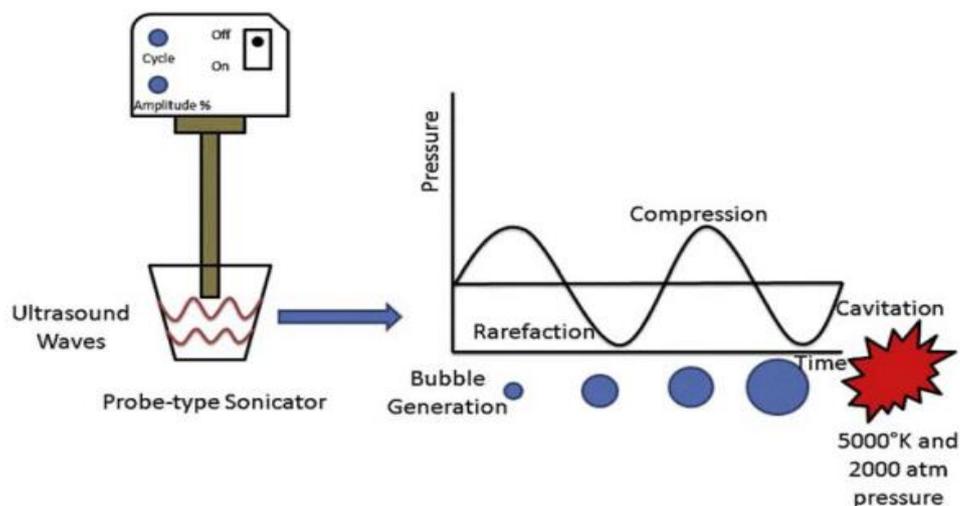


Figure 11 : Schéma du dispositif de l'extraction des polyphénols assistée par les ultrasons (Carciocchi *et al.*, 2017).

Deux types de sonicateurs sont principalement utilisés, à savoir le bain à ultrasons et la sonde à ultrasons. Dans le premier cas, la puissance des ultrasons doit être assez forte pour

provoquer la cavitation. L'énergie générée par le bain varie entre 1-5 W/cm², alors que celle produite par la sonde est 100 fois plus élevée.

L'avantage principal de la sonde est que l'énergie est transférée directement dans le milieu d'extraction plutôt que dans le milieu liquide. Ce procédé a été utilisé dans l'extraction des phénols, des antioxydants et des anthocyanines issues des pépins de raisin (Ghafoor *et al.*, 2009). Avec cette méthode, on extrait en 30 min l'huile des pépins de raisin, alors qu'il en faut 6 h avec le soxhlet (Da Porto *et al.*, 2013).

1.1.6.5. Extraction assistée par micro-ondes (MAE)

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques qui possèdent une fréquence variable de 300 MHz à 300 GHz. La rotation du dipôle est induite lorsque les micro-ondes entrent en contact avec les molécules polaires. Une chaleur est libérée lors de l'alignement du dipôle. Elle est uniquement produite par la conversion de l'énergie au sein de la matrice. Par conséquent, le temps de chauffage est réduit. L'augmentation de la température conduit au gonflement et à la rupture des cellules, ce qui permet au soluté d'être libéré dans le solvant (Figure 12). Ensuite, le soluté peut être séparé en utilisant de la distillation.

L'avantage majeur de la MAE est son rendement élevé, sa réduction du temps d'extraction et du solvant utilisé. Comparativement aux autres méthodes, la MAE a fait preuve de rapidité et d'efficacité (Romero-Díez *et al.*, 2019). La MAE a été aussi utilisée comme prétraitement précédant les méthodes d'extraction conventionnelles afin d'améliorer le rendement et réduire le temps d'extraction de 15 min à 90 s (Romero-Díez *et al.*, 2019).

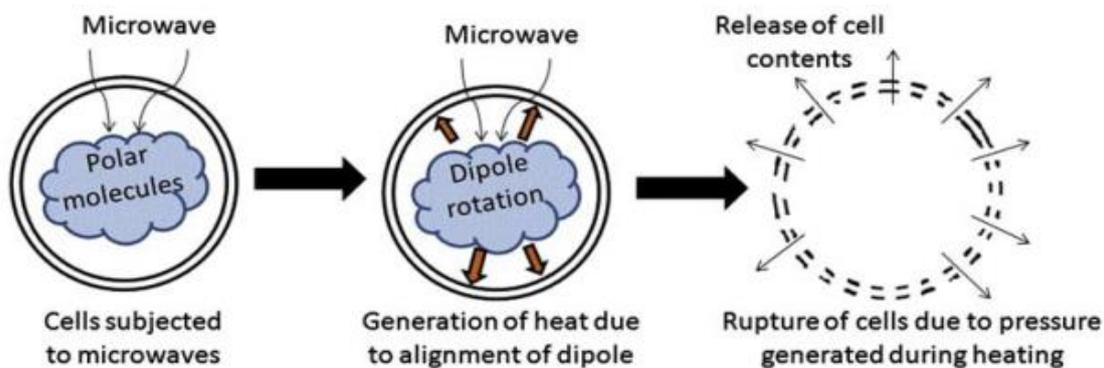


Figure 12 : Mécanisme d'action des micro-ondes dans la lyse cellulaire (Onumaegbu *et al.*, 2018).

1.1.6.6. Extraction à haute pression (HPP)

L'extraction à haute pression (HPP) est utilisée pour les composés thermolabiles, car c'est une technique non-thermique qui utilise de hautes pressions, allant de 100 à 1000 MPa. L'augmentation de la pression engendre des changements structuraux dus à la déprotonation des groupements chargés et à l'interruption des ponts ioniques. Ceci augmente la perméabilité des membranes cellulaires et permet de libérer l'extrait des cellules dans le solvant. Lors du processus, la pression est transférée uniformément de sorte que l'extraction soit réalisée en seulement 1 à 2 min. L'augmentation de la pression accroît le rendement de l'extraction et diminue le temps d'extraction.

Le rendement d'extraction des anthocyanines a été triplé avec la HPP (Corrales *et al.*, 2008). L'étude des différents paramètres d'extraction des anthocyanines issus des pépins de raisin a montré que la concentration d'éthanol (50 à 70°C) à 600 MPa permet d'avoir le meilleur rendement (Corrales *et al.*, 2009). Les composés phénoliques extraits des marcs de raisin avec la HPP ont été encapsulés en utilisant les systèmes de diffusion à base de nano-émulsion (Sessa *et al.*, 2013). Ces dernières ont été produites en utilisant l'huile de tournesol, au vu de sa grande stabilité.

1.1.6.7. Extraction accélérée par les solvants (ASE)

L'extraction accélérée par les solvants (ASE) est connue sous l'appellation d'extraction avec solvant pressuré. Une température et une pression élevées sont appliquées sur le solvant d'extraction. La haute pression conduit à l'augmentation du point d'ébullition, de telle sorte que l'extraction soit réalisée à une température élevée. Ceci qui permet aussi une pénétration profonde du solvant dans l'échantillon et le maintien du solvant dans un état liquide (Richter *et al.*, 1996).

1.1.6.8. Extraction par chauffage ohmique pulsé

Le chauffage ohmique pulsé combine les traitements thermiques et électriques. La chaleur est générée lors de l'application du courant alternatif, ce qui accélère le processus d'extraction des phénols. La perméabilité des membranes cellulaires augmente avec l'augmentation du champ électrique et de la température. Les échantillons congelés-décongelés sont plus susceptibles à l'endommagement cellulaire. L'intensité électrique de 400 V/cm avec 30% d'éthanol, comme solvant, aboutit à un rendement maximum en polyphénols (El Darra *et al.*, 2013).

1.1.6.9. Extraction avec les solvants eutectiques profonds

Les solvants eutectiques profonds (DESs) sont formés de deux ou plus de composés en utilisant le chauffage à 80°C (Abbott *et al.*, 2003) ou la lyophilisation (Gutierrez *et al.*, 2009). Ils sont caractérisés par un faible point de fusion par rapport à leurs matériaux de départ et leurs propriétés peuvent être modifiées par simple changement de ces composés. Comme solvants eutectiques utilisés pour l'extraction des polyphénols, nous pouvons citer le chlorure de choline combiné avec l'urée, l'hydrate de carbone avec l'urée et les sels de chlorure, l'acide décanoïque avec les sels d'ammonium, etc. Leur facilité d'utilisation, leur faible pression de vapeur et leur toxicité réduite font de ces solvants un choix de préférence pour l'extraction des polyphénols.

L'extraction des anthocyanines à partir des pelures de raisin en utilisant les DESs (acide citrique et maltose) a prouvé son caractère écologique en tant que méthode d'extraction (Jeong *et al.*, 2015). De plus, le rendement d'extraction de polyphénols issus des pelures de raisin a été amélioré en utilisant un DES constitué de chlorure de choline et d'acide oxalique comme donneur d'hydrogène (Bubalo *et al.*, 2016). Les rendements en phénols totaux et en anthocyanines totaux obtenus avec les DESs étaient de 91 et 24 mg g⁻¹ de matière sèche, respectivement (Radošević *et al.*, 2016).

1.1.7. Activités biologiques des polyphénols issus des sous-produits oléicoles

La littérature rapporte plusieurs activités mises en évidence pour les polyphénols issus de diverses sources, particulièrement celles des sous-produits d'origines végétales. Ainsi, il est établi que les polyphénols de l'olive et des sous-produits-oléicoles possèdent les propriétés suivantes : anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-athérosclérotiques, anti-tumorales, anti-bactériennes, anti-virales et cardioprotectives (Alarcon De La Lastra *et al.*, 2001 ; Tripoli *et al.*, 2005 ; Khan *et al.*, 2007 ; Waterman et Lockwood, 2007 ; Servili *et al.*, 2009 ; Ciceracle *et al.*, 2010 ; Omar, 2010a,b).

1.1.7.1. Activité anti-oxydante et anti-inflammatoire

L'oxydation est à la base des dégradations alimentaires et du vieillissement des tissus biologiques. Les espèces réactives à l'oxygène (ROS) (H_2O_2 , $\text{HO}\cdot$, $\text{NO}\cdot$, O_2^- , $^1\text{O}_2$) agissent comme des agents oxydants en attaquent les protéines, les acides nucléiques, les acides gras insaturés, et les vitamines. Plusieurs systèmes de défense existent naturellement chez l'homme et les animaux pour neutraliser les agents oxydants. Ces antioxydants regroupent des enzymes de détoxification (telles que la glutathion peroxydase, la catalase, la superoxyde dismutase, la glutathion réductase) et la complexation du fer et du cuivre par des antioxydants de l'organisme (Berset, 2005).

L'apport alimentaire est la deuxième source des antioxydants. Par exemple, Les sécoiridoïdes de l'huile d'olive et des sous-produits oléicoles et autres composés phénoliques sont susceptibles de réagir avec les espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'oleuropéine et ses dérivés tyrosol et hydroxytyrosol ont démontré leur propriété de piégeage des radicaux libres *in vitro* ainsi que *in vivo* dans plusieurs investigations (Visioli *et al.*, 2000a ; Visioli *et al.*, 2000b). Ces composés sont capables à piéger les (ROS) tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion superoxyde (O_2^-), et les espèces réactives à l'azote telles que le monoxyde d'azote ($\text{NO}\cdot$) et le peroxydinitrite (ONOO^-) (Salami *et al.*, 1995 ; Visioli, *et al.*, 1998 ; De La Puerta *et al.*, 2001 ; Moreno, 2003 ; O'Dowd *et al.*, 2004).

L'effet anti-inflammatoire des polyphénols est observé par diminution du stress oxydatif grâce à leur activité de piégeage des radicaux libres. Les polyphénols peuvent aussi inhiber les enzymes impliquées dans la mobilisation de l'acide arachidonique, à savoir la cyclooxygénase et la lipooxygénase (Bitler *et al.*, 2005 ; Puel *et al.*, 2006). Ces enzymes réduisent les médiateurs de l'inflammation (thromboxane B_2 , leukotriène B_4 , interleukine 1) (Miles *et al.*, 2005 ; Visioli *et al.*, 2005 ; Bogani *et al.*, 2007). La production des interleukines 1- β par les monocytes est réduite grâce l'oleuropéine glucoside (Miles *et al.*, 2005). De plus, il est rapporté que le tyrosol et l'hydroxytyrosol pouvaient interférer dans le contrôle de l'expression des gènes de l'inflammation, en particulier le gène NF κ B (Moreno *et al.*, 2003 ; Maiuri *et al.*, 2005).

1.1.7.2. Activité anti-athérosclérotique et cardioprotectrice

Selon plusieurs études, le changement au niveau des lipoprotéines de faible densité (LDL) est impliqué dans le développement de l'athérosclérose. Aussi, cette molécule est considérée comme un biomarqueur dans le cas des maladies cardiovasculaires (Manna *et al.*, 2004 ; Perona *et al.*, 2006). A une certaine dose, l'hydroxytyrosol et l'oleuropéine protègent les molécules de LDL contre l'oxydation par le radical peroxy et les métaux Salami *et al.*, 1995 ; Galli et Visioli, 1999 ; Fito *et al.*, 2000 ; Wiseman *et al.*, 2002). Les études *in vivo* ont démontré

que les LDL des animaux ayant reçu un régime riche en hydroxytyrosol et en oleuropéine étaient plus résistantes à l'oxydation et que leur cholestérol sérique ainsi que la concentration des triglycérides étaient réduites. Il est aussi rapporté que dans certains cas, l'hydroxytyrosol et l'oleuropéine pouvaient augmenter le taux des lipoprotéines à haute densité (HDL) et réduire la pression artérielle (Huang *et al.*, 1991; Coni *et al.*, 2000 ; Benkhatli *et al.*, 2002 ; Marrugat *et al.*, 2004 ; Fito *et al.*, 2005 ; Fki *et al.*, 2005).

La résistance à l'oxydation est due à l'incorporation des molécules LDL par les polyphénols et autres antioxydants de source différente (De La Torre *et al.*, 2007). De plus, l'huile d'olive peut également empêcher la survenue des troubles cardiovasculaires et la formation de la plaque athérosclérotique par la réduction de la production des médiateurs de l'inflammation (Petroni *et al.*, 1997 ; De La Puerta *et al.*, 1999 ; Andrikopoulos *et al.*, 2002 ; Ruano *et al.*, 2005 ; Gonzalez-Santiago *et al.*, 2006 ; Singh *et al.*, 2007 ; Bogani *et al.*, 2007).

1.1.7.3. Activité anti-tumorale, anti-proliférative et anti-mitotique

Il est rapporté que l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol possèdent des effets protecteurs contre les cancers du sein, du colon, de la prostate et de la peau (Trichopoulou *et al.*, 1995 ; Budiyo *et al.*, 2000 ; Owen *et al.*, 2000 ; Quiles *et al.*, 2002 ; Babich et Visioli, 2003 ; Corona *et al.*, 2007). Ces molécules agissent essentiellement sur la prolifération, l'apoptose, la différenciation et la migration des cellules cancéreuses (Della Ragione *et al.*, 2000 ; Lopez *et al.*, 2004 ; Fabiani *et al.*, 2006 ; Abaza *et al.*, 2007). D'après Hamdi et Castellon (2005), l'oleuropéine peut inhiber la prolifération et la migration des cellules tumorales (sein et colon) en empêchant la réplication, la motilité et l'invasion de ces cellules. Elle peut également affecter le cytosquelette par rupture de l'organisation des filaments d'actines dans les cellules. De plus, l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol auraient un effet protecteur contre les altérations génétiques qui conduisent à l'activation oncogénique (Menendez *et al.*, 2007).

1.1.7.4. Activité anti-microbienne et anti-virale

L'activité anti-microbienne de l'oleuropéine, hydroxytyrosol et tyrosol, ainsi que d'autres phénols a été étudiée *in vitro* contre plusieurs pathogènes tels que *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus*, et aussi contre les mycoplasmes, champignons, virus et protozoaires (Fleming *et al.*, 1973 ; Furneri *et al.*, 2002 ; Del Rio *et al.*, 2003 ; Winkelhausen *et al.*, 2005 ; Battinelli *et al.*, 2006 ; Soler-Rivas *et al.*, 2006 ; Sousa *et al.*, 2006 ; Baidez *et al.*, 2007). L'effet anti-microbien des polyphénols est relié à leur capacité à dénaturer les protéines en agissant en surface. Cette action conduit au déversement du contenu cellulaire des bactéries. Cet effet pourrait être le résultat de la destruction du peptidoglycane et la dégradation de la membrane cellulaire.

L'activité anti-virale a été également décrite, notamment contre les virus de l'immunodéficience (HIV) (Lee-Huang *et al.*, 2003 ; Micol *et al.*, 2005 ; Lee-Huang *et al.*, 2007). L'hydroxytyrosol et le tyrosol sont des inhibiteurs de la fusion et de l'intégration de l'HIV-1 dans la cellule hôte. L'oleuropéine peut aussi interférer avec la synthèse des acides aminés nécessaires à l'activité virale, à la diffusion, au développement et à l'attaque membranaire de la cellule (Lee-Huang *et al.*, 2007).

1.1.7.5. Activité anti-vieillessement

Il a été rapporté que le vieillissement est un facteur de risque d'une large gamme de maladies telles que les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, Huntington, sclérose amyotrophique latérale), les maladies inflammatoires et le diabète de type 2 (Saxena *et al.*, 2011 ; Wang *et al.*, 2012 ; Si et Liu, 2014 ; Kennedy *et al.*, 2014). Plusieurs études ont démontré l'impact bénéfique des polyphénols de différentes sources alimentaires sur ces maladies.

L'étude de l'effet des polyphénols de l'huile d'olive vierge sur la production des médiateurs de l'inflammation par les cellules humaines a révélé que l'oleuropéine glycosylé inhibait l'interleukine1- β à 80% par comparaison à l'acide caféique 40% (Miles *et al.*, 2005). De plus, l'administration de l'oleuropéine a amélioré la tolérance au glucose (Poudyal *et al.*, 2010 ; Khalili *et al.*, 2017) et elle a réduit la résistance à l'insuline ainsi que la sensibilité envers celle-ci (Kim *et al.*, 2014 ; Lepore *et al.*, 2015). L'oleuropéine a aussi démontré son pouvoir d'induction d'autophagie des cellules agrégées et organelles endommagées. Le processus d'autophagie est un processus déficitaire chez les patients souffrant d'Alzheimer (Cordero *et al.*, 2018).

1.1.7.6. Autres bioactivités

Beaucoup d'autres activités ont été attribuées aux polyphénols de l'olive et des sous-produits oléicoles telles que le renforcement du système immunitaire (Visioli *et al.*, 1998) ainsi que la prévention de certaines maladies liées au stress oxydatif, aux troubles inflammatoires telles que l'ostéoporose (Puel *et al.*, 2004) ainsi qu'aux maladies rhumatismales (Linos *et al.*, 1999). Les polyphénols ont aussi démontré un effet protecteur de la peau en intervenant contre la peroxydation des lipides engendrée par les rayonnement UV (Meeran *et al.*, 2009).

1.1.8. Applications industrielles des polyphénols issus des sous-produits oléicoles

La recherche dans les sous-produits oléicoles vise à améliorer les produits alimentaires et leurs propriétés ainsi qu'à obtenir des additifs naturels innovants pour les cosmétiques, médicaments, etc. (Pérez *et al.*, 2021).

L'industrie agroalimentaire s'intéresse à introduire les antioxydants naturels dans les emballages pour préserver les produits alimentaires et prolonger leur durée de vie, tout en maintenant les caractéristiques organoleptiques intactes. Dans ce contexte, le secteur de l'emballage alimentaire développe des matériaux issus des sous-produits agricoles, tels que les fibres lignocellulosiques des grignons d'olive (Nunes *et al.*, 2016).

Par ailleurs, Luzi *et collaborateurs* (2019) ont développé un film ternaire pour l'emballage alimentaire actif. Il est constitué de l'alcool polyvinylique comme matrice polymérique et de l'amidon nanostructuré pour le renforcement, ainsi que l'hydroxytyrosol comme agent antioxydant. La littérature montre qu'il y a un effet prolongé de libération de l'hydroxytyrosol à partir du film ternaire avec une forte activité antioxydante.

Cejudo *et collaborateurs* (2022) ont utilisé l'extrait des feuilles d'olivier dans les films polyéthylène téréphtalate/polypropylène, où l'oleuropéine et la lutéoline-7-glucoside étaient les principaux antioxydants phénoliques. L'efficacité de ce film vis-à-vis de l'oxydation des lipides a été évaluée durant le stockage des graines de tournesol. Les résultats ont montré un retard d'oxydation des lipides.

D'autres applications se trouvent également dans l'industrie du cosmétique. A titre d'exemple, différentes concentrations des composés phénoliques tels que l'hydroxytyrosol, le tyrosol et l'oleuropéine issus des margines ont été utilisés comme boosters dans les filtres UV. L'absorption des filtres UV augmente en fonction de la concentration des composés phénoliques, et le piégeage des phénols d'olive dans les particules de silice a amélioré leur résistance à l'eau ([Galanakis et al., 2018](#)).

Partie II : Protéines du lait

1.1.1. Production du lait

D'après les données de la [FAO \(2020\)](#) la production mondiale du lait a atteint 906 millions de tonnes en 2020, avec une hausse de 33% par rapport à 2007. Il a été rapporté que la production mondiale du lait devrait augmenter de 1.6 % par an ces dix prochaines années (pour atteindre 997 millions de tonnes en 2029), soit plus vite que celle de la plupart des principaux produits agricoles ([OECD/FAO, 2020](#)). Par ailleurs, la production mondiale du lait de vache dépasse les 734 millions de tonnes en suivant la même tendance ([Figure 13](#)).

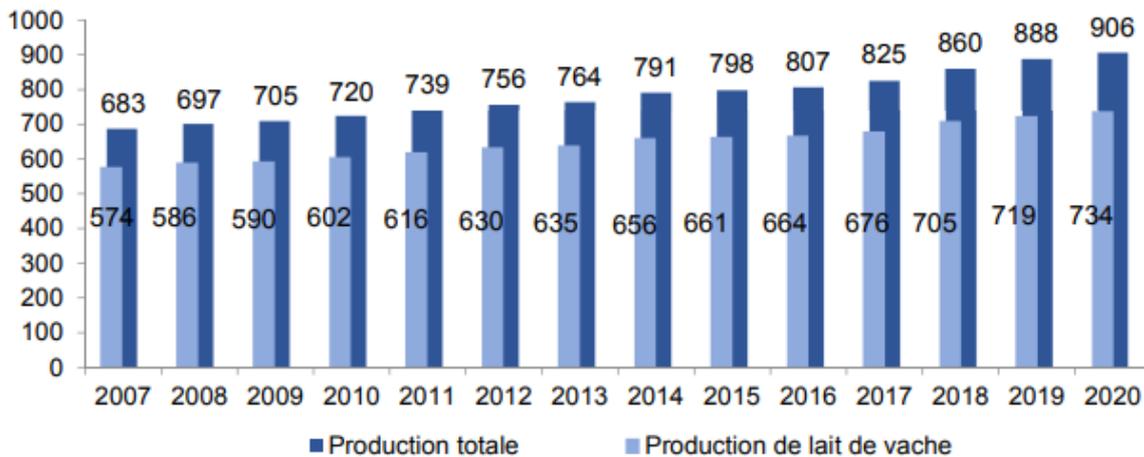


Figure 13 : Production laitière mondiale (millions de tonnes) ([Anonyme 1, 2020](#)).

La production du lait de vache représente 81% de la production mondiale de lait, le lait de bufflonne 15%, et les autres types de laits (chèvre, brebis et chamelle) représentent 4%. La [figure 14](#) illustre la répartition globale du lait de vache.

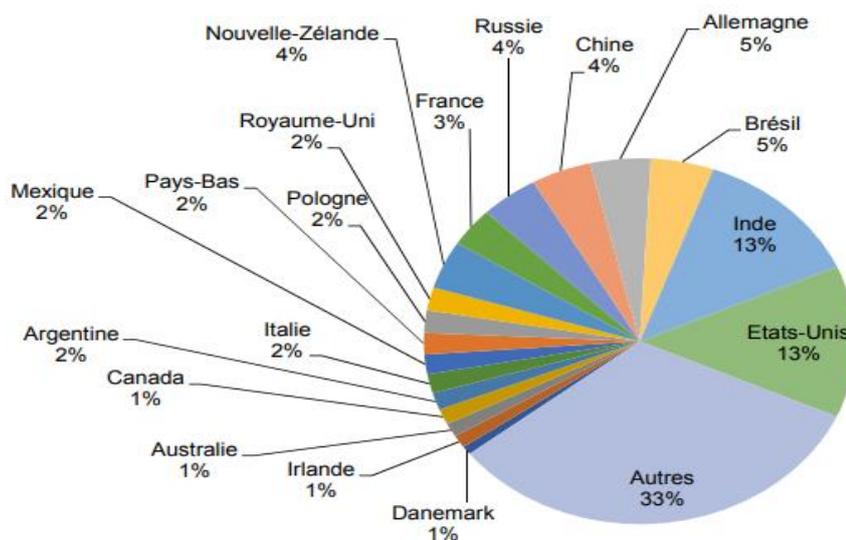


Figure 14 : Répartition de la production mondiale du lait de vache (734 millions de tonnes) ([Anonyme 2, 2020](#)).

D'autre part, la production du lactosérum, co-produit de la fabrication fromagère, est estimée à environ 180 à 190 x10⁶ de tonnes/an, dont seulement 59% est utilisée industriellement (Figure 15) (Richards *et al.*, 2002 ; Yorgun *et al.*, 2008). Il a été rapporté que la production de 1–2 kg de fromage peut générer 8–9 kg de lactosérum (Rektor *et al.*, 2004 ; Atrá *et al.*, 2005).

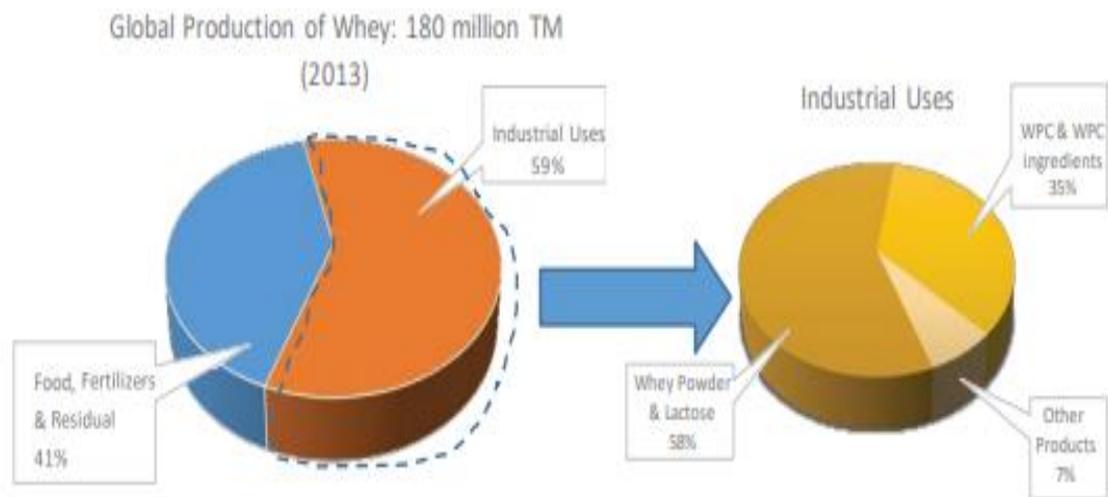


Figure 15 : Production globale du lactosérum et ses utilisations (Pais Chanfrau, 2013).

1.2.2. Composition générale du lait

Le lait est un liquide biologique sensé contenir tous les nutriments requis pour les nouveaux-nés des mammifères. Par conséquent, la composition du lait diffère en fonction des besoins du nouveau-né des différentes espèces (El-Agamy, 2006). Le lait contient de l'eau et plusieurs groupes de nutriments. Les composés organiques (protéines, glucides et lipides) sont présents à des teneurs assez proches (de 30 à 40 g L⁻¹). Il contient également des éléments fonctionnels tels que les vitamines (B, C, A, D), les enzymes (lipase, phosphatase alcaline, protéases, catalase, etc.) et des sels dissous tels que les phosphates, calcium, magnésium, potassium et sodium. En outre, le lait comporte des gaz dissous (5% par volume) tels que le dioxyde de carbone (CO₂), le nitrogène (N) et l'oxygène (O₂), des composés protéiques non azotés (ammoniac, urée, acide urique, etc.) et enfin des pigments (riboflavine et xanthophylle) (Gautheron et Lepouze, 2012).

Du point de vue chimique, le lait est une émulsion d'huile dans l'eau où la fraction lipidique est principalement localisée dans des gouttelettes sphériques appelées globules lipidiques (Sichien *et al.*, 2009). La composition du lait varie en fonction de plusieurs facteurs tels que l'espèce, la race, la variation individuelle, la saison, l'âge, le stade de lactation, l'alimentation, etc. (Haenlein, 2004 ; Claeys *et al.*, 2014).

1.2.3. Protéines du lait

Le lait bovin contient entre 30 à 36 g L⁻¹ de protéines. La teneur en protéines dépend de la race, le stade de lactation, la santé et l'alimentation de l'animal (Fox, 2011). Les protéines majeures du lait sont subdivisées en caséines, qui représentent approximativement 79% des protéines totales et les protéines sériques (environ 19% du total protéique), (Topel, 2004), ainsi

que des protéines mineures qui sont associées au lactosérum à l'exception des protéines membranaires du globule gras. Le [tableau I](#) récapitule la composition du lait bovin en protéines.

Tableau I : Composition protéique du lait bovin ([Walstra et al., 1984](#)).

	Concentration dans le lait (g kg ⁻¹)	Proportion des protéines totales (%)
Protéines totales du lait	32.7	100.0
Caséine	26.0	79.5
α_{S1} -caséine	10.0	30.6
α_{S2} -caséine	2.6	8.0
β -caséine	9.3	28.4
γ -caséine	0.8	2.4
κ -caséine	3.3	10.1
Protéines sériques	6.3	19.3
β -Lactoglobuline	3.2	9.8
α -Lactalbumine	1.2	3.7
Albumine sérique bovine	0.4	1.2
Immunoglobulines	0.7	2.1
Protéines mineures	0.8	2.4
Protéines du globule gras membranaire	0.4	1.2

1.2.3.1. Caséines

Les caséines sont des phosphoprotéines qui se présentent en agrégat micellaire (avec des cations bivalents : calcium et magnésium). Cette organisation permet une dispersion très stable des fractions hydrophobiques dans un état colloïdal sous l'action des liaisons hydrophiles. La fraction de caséine comprend la caséine α_{S1} (32%), la caséine α_{S2} (10%), la caséine β (28%) et la caséine κ (10%) ([Tableau II](#)). La fraction totale des caséines est isolée par précipitation au pHi en rajoutant l'acide ou via l'utilisation de la présure. Dans les deux cas un co-produit (lactosérum) est généré ([O'Kennedy, 2011](#)).

Tableau II : Composition de la micelle de caséine bovine ([Mcmahon et Brown, 1984](#)).

Composé	Teneur (100g/micelles)	Composé	Teneur (100g/micelles)
α_{S1} -caséine	35.6	magnésium	0.1
α_{S2} -caséine	9.9	sodium	0.1
β -caséine	13.6	potassium	0.3
κ -caseine	11.9	citrate	0.4
Caséines mineures	2.3	acide sialique	0.3
calcium	2.9	galactose	0.2
phosphate	2.9	galactosamide	0.2

1.2.3.2. Protéines sériques

Les protéines sériques sont des protéines globulaires structurées autour des hélices alpha. Les acides aminés acido/basiques, hydrophiliques et hydrophobiques y sont répartis d'une manière équilibrée tout au long de la chaîne polypeptidique ([Evans, 1982](#)). Ce sont des protéines solubles obtenues après précipitation des caséines au pH 4.6 à 20°C. Elles regroupent, d'une

part, une fraction protéique (80%) constituée de la β -lactoglobuline (β -Lg), l' α -lactalbumine (α -La), l'albumine sérique bovine (BSA), les immunoglobulines et la lactoferrine et, d'autre part, une fraction non protéique (20%) composée des protéoses peptones et de composés nitrogéniques (Tableau III) (Smithers, 2008).

Tableau III : Profil protéique du lactosérum (Eigel *et al.*, 1984 ; Brew *et al.*, 1970 ; Korhonen 1995 ; de Wit, 1998).

Protéine	Concentration (g L ⁻¹)	Poids moléculaire (kDa)	Nombre d'acides aminés
β-Lactoglobuline	1.3	18.277	162
α-Lactalbumine	1.2	14.175	123
Sérum albumine bovine	0.4	66.267	582
Immunoglobulines (A,M,C)	0.7	25.000 (chaîne légère) + 70.000 (chaîne lourde)	-
Lactoferrine	0.1	80.000	700
Lactoperoxidase	0.03	70.000	612
Glycomacropéptide	1.2	6700	64

Les protéines sériques ont été également scindées en deux fractions selon leur importance quantitative, à savoir : les protéines majeures qui regroupent la β -lactoglobuline (~50% des protéines totales du lactosérum), α -lactalbumine (~25%), l'albumine sérique bovine (~6%), les immunoglobulines et les protéose-peptones (~10 % pour chaque entité). Dans l'autre fraction, on retrouve la lactoferrine (LF), la lactoperoxidase (LP), la plasmine, etc. Au vu de leurs rôles biologiques variés, ces fractions ont fait l'objet de nombreuses investigations qui ont permis de mieux les caractériser en considérant leur poids moléculaire, leur point isoélectrique, leurs propriétés de dénaturation, leur réactivité chimique, leur capacité de complexation et leur comportement dans le milieu (Mulvihill et Ennis, 2003 ; Bonnaillie et Tomasula, 2009).

1.2.3.2.1. Protéines majeures

Les protéines majeures du lactosérum (β -Lg, α -La, BSA, Igs) représentent plus de 95% de la fraction non caséinique. La β -Lg et l' α -La sont toutes les deux synthétisées dans la glande mammaire. Par contre la BSA est transportée vers la glande mammaire via le sang.

La β -Lg est une protéine constituée de 162 acides aminés de 18 000 Da. Elle a cinq résidus cystéines qui forment des liaisons disulfures entre les résidus 66-160, 119-121, ou 106-119 (Figure 16).

Cette protéine se trouve sous forme de dimer au pH 3 à 7. La β -Lg est impliquée dans le transport du rétinol et l'activation de la lipase (O'Mahony et Fox, 2013).

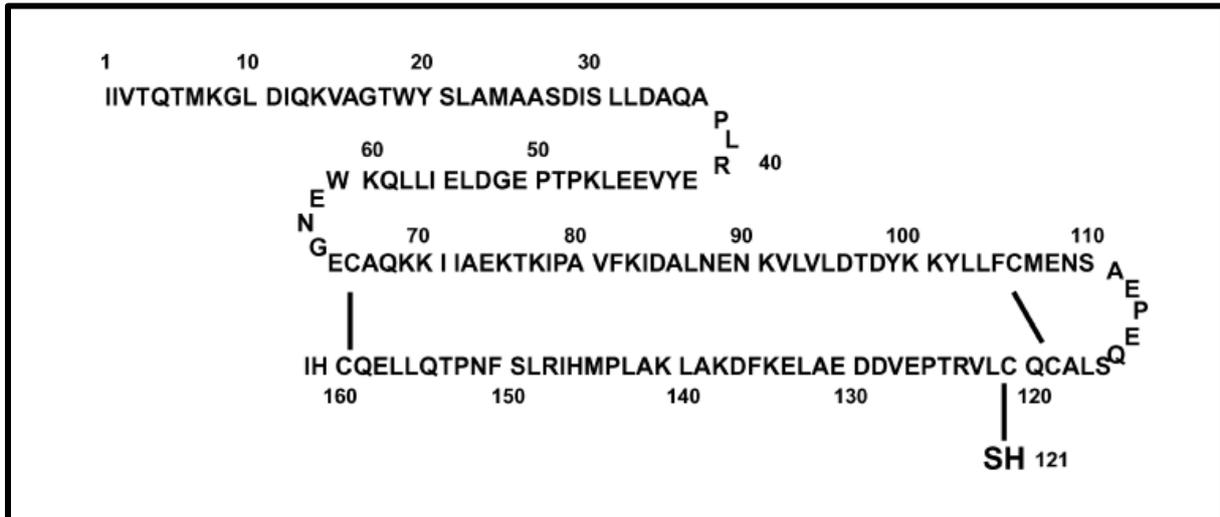


Figure 16 : Structure primaire de la β -lactoglobuline (Liu *et al.*, 2007).

Pour sa part, l' α -La est la plus petite protéine parmi les protéines majeure avec un poids moléculaire de 14 175 Da. Elle est constituée de 123 acides aminés avec huit résidus cystéine connectés par des ponts disulfures au niveau des positions 6-120, 28-111, 61-77, et 73-91 (Figure 17). Elle joue un rôle important dans la biosynthèse du lactose et possède une capacité à se lier aux cations bivalents (calcium, fer, zinc, etc.). Certaines formes mineures de l' α -La contiennent des entités carbohydratés telles que le mannose, le galactose, le fructose, le N-acétylgalactosamine et l'acide N-acétylneuraminique (Farrell *et al.*, 2004).

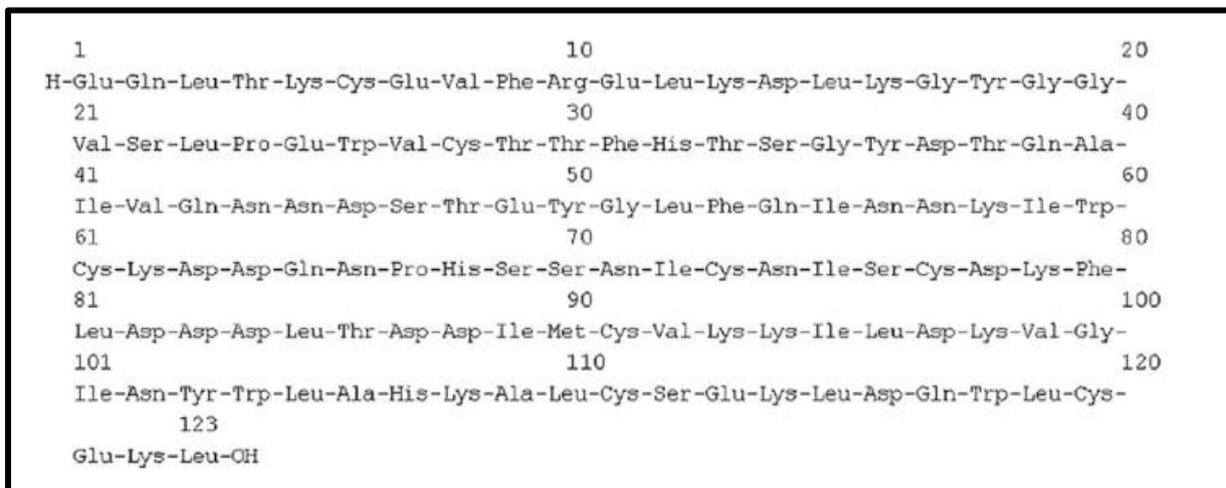


Figure 17 : Structure primaire de l' α -lactalbumine (Eskin et Goff, 2013).

La BSA est formé de 583 acides aminés dont 35 résidus de cystéine. Ces résidus (sauf Cys34) forment des ponts disulfure (Figure 18). Cette protéine de 66 465 Da possède différents domaines qui se distinguent de part leur hydrophobicité, leur charge nette et les sites de liaison au ligand. La BSA est une protéine multifonctionnelle avec une capacité exceptionnelle de liaison au ligand. Cette protéine est bien connue pour son pouvoir liant aux acides gras, aux

composés phénoliques et aux ions métalliques. La solubilité des acides gras liés à la BSA est améliorée de façon remarquable (Belinskaia *et al.*, 2021).

DTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIAFSQYLQPCPFDEHVK L⁴²VNELTEF A⁵⁰KTCVADESH
 AGCEKSLHTLF G⁷¹DELCKVASLR E⁸²TYGDMADC90CEKQEPER N⁹⁹ECF L¹⁰³SHKDDSPD
 LPK L¹¹⁵K P¹¹⁷DPNTLCDEF K A¹²⁸DEKKFWGK YLYEIARR HPYF YAPELLYANKYN
 GVF Q¹⁶⁵ECCQAEDK GACLLPK I¹⁸¹ETMREK V¹⁸⁸LA S¹⁹¹SARQR L¹⁹⁷R C¹⁹⁹A S²⁰¹IQ
 KF G²⁰⁶ER A²⁰⁹ L²¹⁰K A²¹²WSVAR L²¹⁸SQKF P²²³K A²²⁵ E²²⁶FVEVTK L²³³VTDLTKVH
 K E²⁴³CCHGDLLECADDRADLAKYICDNQDTISSKLKECCDKP LLEK S²⁸⁶HCIAEVEKDAIPE
 NLPLTA D³⁰⁷FAEDK D³¹³VCKNYQEAKDA F³²⁶LGSF L³³⁰YEYSRR H³³⁷PEYA V³⁴²SVLL
 R L³⁴⁸AK E³⁵¹YEATLEECCA K D³⁶³DPHA C³⁶⁸YSTVFDK L³⁷⁶KHLVDEPQNLIKQNCQDFE
 KLGEYGFQNALIVRYTRK V⁴¹⁴PQVSTPTLVEVSR S⁴²⁸LGKVGTR C⁴³⁶CTKPESER M⁴⁴⁵PC
 TEDYLSLILNRLCVLHEKTPVSEKVTKCTESLVNRRPCF S⁴⁸⁸ALTPDETYVPKA F⁵⁰¹DEKLF
 TFHADICTLPDTEK Q⁵²¹IKKQALVELLK HKPKATEEQLK T⁵⁴⁵VMENFVA F⁵²⁸VDKCC
 AADDKEACFAVEGPKLVVSTQTALA⁵⁸³

Figure 18 : Structure primaire de l'albumine sérique bovine (Byrne *et al.*, 2015).

R=Arg, N=Asn, D=Asp, E=Glu, Q=Gln, K=Lys, F=Phe, W=Trp, Y=Tyr

Les autres acides aminés sont représentés par la première lettre de leur appellation.

Les immunoglobulines représentent les protéines les plus volumineuses et denses de ce groupe (PM >1 000 000 Da). Elles sont classées en IgG, IgA, IgM, IgE et IgD. Elles se trouvent sous forme de monomères ou de polymères d'une unité de base constituée de deux chaînes légère et lourde.

Les régions variables des chaînes légère et lourde sont responsables de la liaison à l'antigène. Par contre, les fonctions de la fixation du complément, le transport membranaire, le catabolisme et l'hypersensibilité immédiate sont attribuables à la région constante de la chaîne lourde. Les immunoglobulines sont impliquées dans la protection contre les infections et dans l'immunité passive (Marnila et Korhonen, 2011; Hurley et Theil, 2013).

1.2.3.2.2. Protéines mineures

La lactoferrine est une glycoprotéine consistant en une seule chaîne polypeptidique de 690 acides aminés de 80 000 Da. Son pHi est singulièrement de ~8.0 alors que la plupart des protéines sériques ont un pHi acide (4.5 à 5.5). Cette particularité lui permet d'avoir une forte charge positive à la surface au pH neutre (Ye et Singh, 2006a). La lactoferrine est connue pour sa capacité à se lier au fer (Baker et Baker, 2005). Elle est impliquée dans plusieurs fonctions telles que la prolifération et la différenciation cellulaire, la régulation de la granulopoïèse et l'activation de la réponse immunitaire non spécifique (Kanyshkova *et al.*, 2001).

La lactoperoxydase (EC 1.11.1.7) (LPO) est une glycoprotéine de 78 000 Da consistant en une chaîne polypeptidique de 612 acides aminés. Elle contient un groupe hémique

ferritoporphyrine IX, lié par deux groupements esters Glu375 et Asp275 au niveau du site actif. La lactoperoxydase est connue pour ses propriétés antimicrobiennes (O'Mahony *et al.*, 2013).

Le glycomacropeptide (GMP) est le produit d'hydrolyse de la κ -caséine au niveau de la liaison Phe-Met (105-106) à travers l'action de la chymosine ou de la digestion avec la pepsine. Ce peptide de 64 acides aminés, fortement glycosylé, est caractérisé par sa composition en acide sialique. Ce dernier joue un rôle dans la prévention de l'adhésion intestinale des pathogènes (Bailei *et al.*, 2017). De plus, en raison de sa faible composition en acide aminé aromatique, le glycomacropeptide pourrait être une protéine intéressante pour la phénylcétonurie, maladie où la phénylalanine n'est pas métabolisée (Pellegrino *et al.*, 2013).

1.2.3.3. Comparaison interespèces des protéines

Le lait des différentes espèces présentent des variations de composition ainsi que des caractéristiques physico-chimiques différentes. Le [tableau IV](#) montre la composition générale du lait des différentes espèces. Il apparaît que le lait ovine est le plus concentré en protéines, en matière grasse et minéraux. Des concentrations similaires sont observées pour le lait bovin et caprin. Le lait camelin possède les concentrations les plus faibles en matière grasse et en minéraux.

Tableau IV : Composition générale du lait de différentes espèces (Konte, 1999).

	Composition %				
	Eau	lipides	Protéines	Lactose	Cendre
Bovine	87.2	3.7	3.5	4.9	0.72
Caprine	86.5	4.0	3.6	5.1	0.82
Ovine	82.7	6.4	5.5	4.7	0.92
Cameline	87.7	3.4	3.5	4.7	0.71

De plus, il a été observé que la concentration des protéines individuelles au niveau des fractions de caséines et lactosérum varie aussi entre les quatre espèces ([Tableau V](#)). Il est notable que le lait camelin se distingue par sa richesse en α -lactalbumine ainsi que par l'absence de β -lactoglobuline dans le lactosérum. La déficience de ce lait en β -lactoglobuline pourrait être intéressante pour la consommation, vue que cette protéine est considérée comme l'un des allergènes majeurs responsable des allergies chez l'enfant (El Hatmi *et al.*, 2015).

Par ailleurs, il est établi qu'un lait présentant un faible ratio caséines:protéines sériques aurait une meilleure digestibilité des protéines. Parmi les différents types de lait existant, c'est le lait humain qui possède le plus faible ratio caséines:protéines sériques (29:71–33:67) et parallèlement un ratio β -caséine:caséines α relativement supérieur. Cette propriété permet au lait camelin de se rapprocher d'avantage du lait humain et d'être le candidat de choix pour les formules infantiles (Tari *et al.*, 2018).

Tableau V : Composition protéique du lait des différentes espèces (Roy *et al.*, 2020).

	Concentration dans le lait (g L ⁻¹)				
	Bovin	Caprin	Ovin	Camelin	Humain
Caséines totales	24.6-28	23.3-46.3	41.8-52.6	22.1-26.0	2.4-4.2
Protéines sériques totales	5.5-7.0	3.7-7.0	10.2-16.1	5.9-8.1	6.2-8.3
Ratio caséines/protéines sériques	82:18	78:22	76:24	73 :27-76 :24	29.71-33.67
Caséines majeures					
α_{s1} Caséine	8-10.7	0-13.0	2.4-22.1	4.9-5.7	0.77
α_{s2} Caséine	2.8-3.4	2.3-11.6	6.0	2.1-2.5	Absente
β -Caséine	8.6-9.3	0-29.6	15.6-39.6	14.4-16.9	3.87
κ -Caséine	2.3-3.3	2.8-13.4	3.2-12.23	0.8-0.9	0.14
Protéines sériques majeures					
β -lactoglobuline	3.2-3.3	1.5-5.0	6.5-13.5	Absente	Absente
α -lactalbumine	1.2-1.3	0.7-2.3	1-1.9	0.8-3.5	1.9-3.4

En outre, des différences au niveau des séquences primaires ont été rapportées pour les différentes espèce de lait. Par exemple, la séquence des protéines bovines montrent 87.6 % d'homologie avec celles des protéines caprines et 58.4 % avec le lait humain (Tableau VI) (Roncada *et al.*, 2012 ; Tsabouri *et al.*, 2014). Cette hétérogénéité inter-espèce des protéines, principalement dues au facteur génétique, détermine leurs structures et leurs propriétés physico-chimiques ainsi que leur allergénicité (Ng-Kwai-Hang, 2011).

Tableau VI : Comparaison des séquences d'acides aminés des protéines majeures du lait bovin, caprin, ovin, camelin et humain (Tsabouri *et al.*, 2014).

	Homologie de séquence (%)			
	Bovin versus Caprin	Bovin versus Ovin	Bovin versus Camelin	Bovin versus Humain
Protéines sériques				
α -lactalbumine	95.1	97.2	69.7	53.2
β -lactoglobuline	94.4	93.9	Absente	Absente
Albumine sérique bovine	71.2	92.4	N.D	76.6
Caséines				
α_{s1} Caséine	87.9	88.3	44.2	31.9
α_{s2} Caséine	88.3	89.2	58.3	N.D
β -Caséine	91.1	92.0	69.2	56.5
κ -Caséine	84.9	84.9	58.4	53.2
Moyenne	87.6	91.1	60.0	58.4

N.D : non disponible.

1.2.4. Méthodes d'obtention des peptides bioactifs

La libération des fragments peptidiques à partir des protéines natives est une condition impérative pour manifester leurs fonctions dans l'organisme vivant. Toutes les protéines du lait possèdent de petits fragments inactifs au sein de leurs séquences précurseurs. Les peptides biologiquement actifs peuvent être essentiellement obtenus par hydrolyse enzymatique, fermentation microbienne ou par des méthodes chimiques ou mécaniques (Korhonen et Pihlanto, 2003b).

1.2.4.1. Hydrolyse enzymatique

Elle représente la méthode la plus communément utilisée dans la production des peptides bioactifs. L'hydrolyse enzymatique est la dégradation des protéines en de petits peptides et/ou acides aminés en utilisant des enzymes protéolytiques. Au cours de l'hydrolyse, les liaisons amides sont clivées. Par conséquent, les peptides et/ou acides aminés libres sont générés (Figure 19). Les produits formés peuvent être de nouveaux substrats pour l'enzyme (Adler-Nissen, 1993).

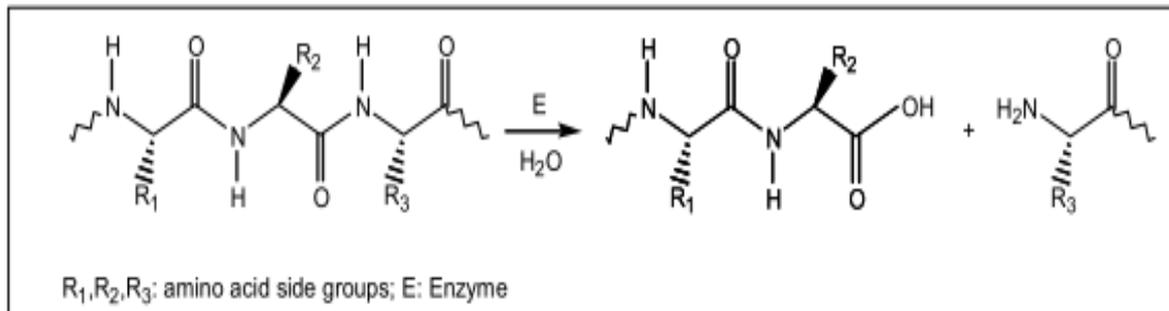


Figure 19 : Réaction d'hydrolyse des protéines (Adler-Nissen, 1993).

Le processus d'hydrolyse se déroule en trois étapes consécutives. Premièrement, il y a la formation du complexe Michaelien (protéine et enzyme), ensuite la liaison peptidique est clivée et le peptide est libéré. Finalement, le peptide restant est clivé par l'enzyme après attaque nucléophile par la molécule d'eau (Adler-Nissen, 1993) (Figure 20).

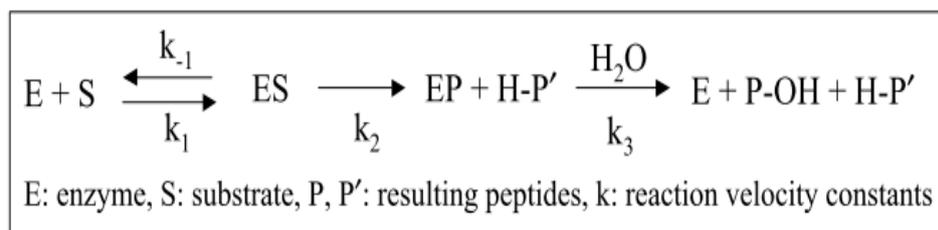


Figure 20 : Mécanisme catalytique des protéases (Adler-Nissen, 1993).

Ainsi, la plupart des peptides bioactifs connus sont obtenus en utilisant les enzymes digestives (pepsine, trypsine). Par exemple, la trypsine est l'enzyme la plus fréquemment utilisée dans la production des peptides inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et des peptides de complexation du calcium (FitzGerald *et al.*, 2004). D'autres enzymes gastro-

interstinales telles que l'alcalase, la chymotrypsine, la pancréatine, la pepsine et la thermolysine sont utilisées dans l'industrie agroalimentaire (Korhonen et Pihlanto, 2003a). De plus, les enzymes provenant des bactéries et champignons ont été également utilisées pour générer des peptides bioactifs à partir de diverses sources de protéines (Korhonen et Pihlanto, 2003b).

Concernant les protéines globulaires, comme c'est le cas des protéines sériques du lait, la plupart des liaisons peptidiques ne sont pas accessibles à l'enzyme, car elles sont situées à l'intérieur de la protéine. Par conséquent, une dénaturation réversible est nécessaire pour permettre l'exposition en surface des liaisons enfouies à l'intérieur de la molécule (postulat de Linderstrøm-Lang). Les états de protéines repliés et dépliés (dénaturée) sont en équilibre en solution. A l'inverse, les protéines dénaturées (ou qui ont naturellement une structure peu ordonnée, comme c'est le cas des caséines) sont susceptibles d'être clivées facilement par des enzymes protéolytiques (Figure 21) (Adler-Nissen, 1986a ; Swaisgood, 1992).

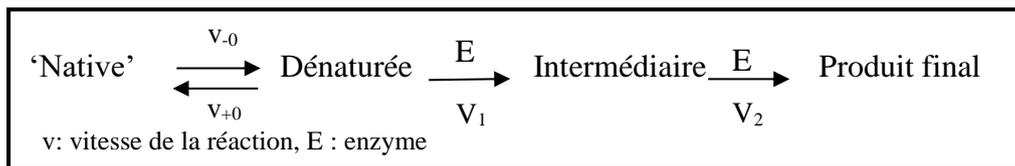


Figure 21: Théorie de Linderstrøm-Lang (Adler-Nissen, 1986a).

Le résultat de la protéolyse dépend de trois facteurs principaux : le substrat, le type de la protéase et les conditions d'hydrolyse.

La composition du substrat en acides aminés et sa structure tridimensionnelle affectent à la fois sa sensibilité envers les protéases et le type de peptide formé durant l'hydrolyse. Ainsi, la digestion des protéines sériques du lait peut être améliorée par un traitement thermique peu dénaturant ou une exposition aux ultrasons pendant des temps assez courts (Reddy *et al.*, 1988 ; Guo *et al.*, 1995 ; Cheng *et al.*, 2021).

L'influence du type de protéase sur l'hydrolyse est due à sa spécificité et au pH, lesquels dépendent de la composition du site catalytique de l'enzyme. Le site actif de l'enzyme pourrait être soit un acide aminé tel que la sérine, la cystéine ou l'acide aspartique, ou bien un ion métallique comme le zinc dans la plupart des cas (Adler-Nissen, 1993). Les protéases à sérine sont toutes des endo-protéases, mais les métallo-protéases sont le plus souvent des exopeptidases (Whitaker, 1994). Les protéases à cystéine et les métallo-protéases sont actives à un pH neutre ; par contre, les protéases à sérine et celles à l'acide aspartique sont actives au pH alcalin et acide, respectivement (Adler-Nissen, 1993).

Les acides aminés présents à l'intérieur du site catalytique sont importants pour la fixation du substrat. Ces acides aminés déterminent quelle liaison sera hydrolysée et donc la spécificité de l'enzyme (Adler-Nissen, 1993). Par ailleurs, la spécificité des enzymes appartenant au même groupe de protéases peut différer. Par exemple, la trypsine, la chymotrypsine et l'élastase sont toutes les trois des endoprotéases à sérine. Cependant, elles ont une spécificité préférentielle pour l'acide aminé du côté carboxylique de la liaison amide. La trypsine préfère les résidus lysine et arginine. Par contre, la chymotrypsine a une préférence

pour les acides aminés aromatiques (phenylalanine, tryptophane, tyrosine). L'élastase préfère les acides aminés avec une courte chaîne latérale tels que l'alanine (Whitaker, 1994).

Notons que les principales variables qui déterminent le résultat de la réaction enzymatique sont la température, le pH, le ratio (enzyme/substrat) et le temps de la réaction. Les trois premiers facteurs déterminent le taux de réaction et peuvent influencer la spécificité de l'enzyme. Le temps de réaction détermine uniquement le degré d'hydrolyse. L'interaction de ces paramètres peut influencer la composition des hydrolysats (Adler-Nissen, 1986a).

1.2.4.2. Fermentation microbienne

La libération des peptides bioactifs à partir des protéines du lait en utilisant la protéolyse microbienne est actuellement assez maîtrisée. Il existe plusieurs souches qui possèdent un fort pouvoir protéolytique (Matar *et al.*, 2003). L'effet bénéfique de ces microorganismes en fermentation tient compte de la production de peptides bioactifs aux multiples propriétés favorables à la santé humaine (Hayes *et al.*, 2007). Par exemple, plusieurs investigations ont confirmé que les souches *L. helveticus* étaient capables de libérer les peptides antihypertenseurs. Les plus connus sont les tripeptides (Val-Pro-Pro) et (Ile-Pro-Pro) et leur capacité a été établie dans les modèles rat et humain (Aihara *et al.*, 2005 ; Mizushima *et al.*, 2004 ; Seppo *et al.*, 2003). De plus Chen *et al.* (2007) ont observé que la fermentation du lait avec cinq souches de bactéries lactiques suivies d'une hydrolyse avec les protéases microbiennes a augmenté l'activité inhibitrice de l'ACE des hydrolysats. Deux tripeptides (Gly-Thr-Trp) et (Gly-Val-Trp) dotés d'une activité inhibitrice de l'ACE ont été identifiés et un effet antihypertenseur est démontré dans le modèle animal.

La protéolyse des protéines du lait avec les bactéries lactiques implique trois étapes. En premier, les protéases de la paroi cellulaire des bactéries lactiques dégradent les protéines en oligopeptides de 4-18 acides aminés. Ensuite, les oligo-, di-, et tripeptides sont internalisés dans les cellules des bactéries lactiques via un système de transport cellulaire spécifique. Enfin, les peptides internalisés sont hydrolysés d'avantage en acides aminés libres (Savijoki *et al.*, 2006).

La préparation des hydrolysats de protéines du lait par la fermentation microbienne passe par l'innoculation de la solution de protéine avec les souches bactériennes (pH et température de la souche), suivi de l'incubation à la durée requise. Les bactéries sont récupérées enfin par centrifugation ou par ultrafiltration (El Salam et El-Shibiny, 2019).

1.2.4.3. Autres méthodes

Les peptides bioactifs peuvent également être obtenus par des processus physiques et/ou chimiques tels que les ultrasons, les microondes et les traitements chimiques (acides et alcalins) (McSweeney et O'Mahony, 2016). Ces méthodes ont en commun leur principe d'action sur les protéines sources où la production de peptides bioactifs résulte de la dénaturation des protéines, entraînant leur dépliement, ce qui aide à exposer en surface les groupements fonctionnels spécifiques. Ceci permet l'augmentation des interactions intermoléculaires avec le milieu et la réduction de la viscosité (He, 2017a).

Les hydrolyses alcalines et acides sont aussi pratiquées aux fins d'obtention de peptides bioactifs, bien qu'en général ces méthodes soient utilisées pour l'étude de la composition des protéines et l'isolement des acides aminés (Griggs, 1920). A titre d'exemple, Khueychai *et al.* (2018) ont identifié un dipeptide antihypertenseur, Tyr-Val à partir de l'ovalbumine avec une

IC₅₀ de 63.97 µg ml⁻¹, en utilisant une hydrolyse alcaline (0.25 M NaOH) à 40 °C pendant 2–10 h. Néanmoins, ces hydrolyses chimiques sont difficilement contrôlables et génèrent des produits de qualités nutritionnelles réduites. Par contre, l'hydrolyse enzymatique est réalisée dans des conditions modérées et ne présente aucun effet indésirable (Killara et Vaghela, 2004).

1.2.5. Activités biologiques des protéines sériques et leurs hydrolysats

Les peptides bioactifs sont par définition des fragments d'hydrolyse de protéines ayant un impact positif sur les fonctions de l'organisme humain et donc sur sa santé (Kitts et Weiler, 2003), en contribuant notamment à réduire le risque de maladies chroniques et en boostant la protection immunitaire naturelle (Hartmann et Meisel, 2007). De ce fait, un certain engouement pour les peptides bioactifs est constaté ces dernières décennies, en raison de leur potentiel à promouvoir la santé humaine.

De nos jours, les protéines du lait sont considérées comme la source la plus importante de peptides bioactifs. En effet, l'administration orale de ces fragments pourrait influencer positivement différents systèmes tels que le système cardiovasculaire, digestif, endocrinien, immunitaire et nerveux.

L'activité de ces peptides dépend de leur séquence et de la composition en acides aminés. La taille des séquences bioactives peut varier de 2 à 20 résidus d'acides aminés. Plusieurs peptides sont connus pour avoir des propriétés multifonctionnelles (Hartmann et Meisel, 2007). Actuellement, des peptides doués d'activités biologiques et issus du sérum du lait ont été identifiés comme régulateurs de fonctions biologiques comme l'activité antihypertensive, antioxydante, antithrombotique, opioïde, antidiabétique, antimicrobienne, immunomodulatrice, cytomodulatrice et chélatrice de minéraux (Hayes *et al.*, 2007).

1.2.5.1. Activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE)

L'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ACE, peptidyl-dipeptidase, EC 3.4.15.1) a été associée au système rénine-angiotensine qui régule la pression artérielle périphérique. L'inhibition de cette enzyme peut avoir un effet antihypertenseur. D'autre part, ce même effet pourrait être également obtenu par d'autres mécanismes tels que l'inhibition de la libération de l'endothéline-1 par les cellules endothéliales (Maes *et al.*, 2004), la stimulation de l'activité de la bradykinine (Perpetuo *et al.*, 2003) et l'amélioration de la production l'oxyde nitrique, dérivé endothéliale (Sipola *et al.*, 2002), ainsi que l'action vasodilatatrice par la liaison aux récepteurs opiacés (Nurminen *et al.*, 2000).

Parmi les peptides inhibiteurs de l'ACE, un grand nombre a été isolé à partir du lactosérum. La capacité d'un peptide à inhiber l'ACE est liée à sa composition en acides aminés, mais aussi à sa séquence primaire. Par exemple, il est rapporté que la présence d'un résidu proline et des acides aminés aromatiques (Trp, Tyr, Phe) en position C-terminale du peptide semble accroître sa capacité d'inhibition de l'ACE (Yamamoto et Takano, 1999 ; Mizuno *et al.*, 2004). Il a aussi été montré que les peptides contenant un résidu Arg en position C-terminale seraient de bons inhibiteurs de l'ACE (Maruyama *et al.*, 1989 ; Meisel et Schlimme, 1994).

Notons que l'hydrolyse avec la trypsine génère la plupart des peptides inhibiteurs de l'ACE (Mullally *et al.*, 1997 ; Naik *et al.*, 2013). La séquence f142-148 (ALPMHIR) libérée par hydrolyse trypsique de la β-Lg possède la plus forte activité d'inhibition de l'ACE (Mullally

et al., 1997b). Elle doit son pouvoir inhibiteur à la charge nette positive conférée par le résidu Arg en position C-terminal de la séquence (Fitzgerald et Meisel, 2000). Le tableau VII dresse la liste de quelques séquences peptidiques à activité antihypertensive.

Tableau VII : Peptides antihypertenseurs identifiés dans le lactosérum.

Séquence peptidique	Protéine source	Référence
IIAEK	β -Lg f(71-75)	Power <i>et al.</i> , (2014)
IPAVFK	β -Lg f(78-83)	
ALPMHIR	β -Lg f(142-148)	Mullally <i>et al.</i> , (1997)
CMENSA	β -Lg f(106-111)	Pihlanto-Leppälä <i>et al.</i> , (2000a)
VLDTDYK	β -Lg f(94-100)	
VAGTW	β -Lg f(15-19)	
VFK	β -Lg f(81-83)	
LAMA	β -Lg f(22-25)	
LDAQSAPLR	β -Lg f(32-40)	
VGINYWLAHK	α -La f(99-108)	
YGL	α -La f(50-52)	

1.2.5.2. Activité antioxydante

Il est admis que la consommation des antioxydants a un effet bénéfique contre le stress oxydatif, parallèlement aux stratégies de défenses endogènes (Fang *et al.*, 2002).

Dans ce cadre, les peptides antioxydants représentent des antioxydants naturels qui présentent un fort intérêt, en raison de leur sécurité sanitaire et disponibilité dans une large gamme de sources protéiques (Brandelli *et al.*, 2015), d'autant que l'utilisation des antioxydants synthétiques (tels que l'hydroxytoluène butylé, l'hydroxyanisole butylé, le gallate de propyle et la tert-butylhydroquinone) se trouve de plus en plus limitée, en raison de leur potentiel toxique sur la santé humaine.

Le mécanisme d'action des peptides antioxydants implique l'inhibition de la peroxydation des lipides, le piégeage des radicaux libres et la chélation des ions métalliques de transition (Qian *et al.*, 2008). Ces peptides exercent leur effet en convertissant la cystéine en glutathion, qui possède un potentiel antioxydant intracellulaire pour préserver les cellules des endommagements par les ROS (espèces réactives à l'oxygène) (Marshall, 2004).

L'activité antioxydante des peptides bioactifs est liée à leur composition en acides aminés, leur structure, leur configuration, leur hydrophobicité et leur emplacement dans la séquence (Chen *et al.*, 1996 ; Chen *et al.*, 1998 ; Saito *et al.* 2003). La présence de certains acides aminés (Tyr, Trp, Met, Lys, Cys, His) est responsable de l'activité antioxydante par chélation d'ions métalliques. En outre, les acides aminés aromatiques contribuent à l'activité antioxydante en donnant un proton aux radicaux qui présentent une déficience en électrons (Wang et Mejia, 2005).

L'hydrolyse enzymatique de la β -Lg avec la corrolase permet de libérer un peptide antioxydant β -Lg (f19-29) avec une activité antioxydante plus efficace que le BHA (butyl hydroxyanisole, E 320). L'activité antioxydante de ce peptide serait due à la présence des résidus Trp, Tyr et Met dans sa séquence (Hernández-Ledesma *et al.*, 2005). Le tableau VIII présente quelques séquences peptidiques à activité antioxydants.

Tableau VIII : Peptides antioxydants identifiés dans le lactosérum.

Séquence peptidique	Protéine source	Référence
INYW	α -La f(101-104)	Sadat <i>et al.</i> , (2011)
LDQW	α -La f(115-118)	
VGINYWLAHK	α -La f(99-108)	Mann <i>et al.</i> , (2015)
VLVLDTDYK	β -Lg f(92-100)	
IDALNEK	β -Lg f(84-91)	
KTKIPAVF	β -Lg f(75-82)	Hernández-Ledesma <i>et al.</i> , (2005)
WYSLAMAASDI	β -Lg f(19-29)	
YVEEL	β -Lg f(42-46)	Athira <i>et al.</i> , (2015)
MHIRL	β -Lg f(145-149)	Contreras <i>et al.</i> , (2011)
VLDTDYK	β -Lg f(94-100)	
VRTPEVDDE	β -Lg f(123-131)	Power <i>et al.</i> , (2014)
LQKW	β -Lg f(58-61)	Zhang <i>et al.</i> , (2013)
LDTDYKK	β -Lg f(95-101)	
FNPTQ	β -Lg f(151-155)	
VAGTWY	β -Lg f(15-20)	
WYSL	β -Lg f(19-22)	

1.2.5.3. Activité anti-diabétique

La régulation du glucose a été reliée à la consommation de peptides bioactifs dérivés du lait. Différents mécanismes sont impliqués tels que l'activité insulinothrompique, l'action sécrétoire des incrétines et l'action sur différentes enzymes métaboliques impliquées dans la régulation du glucose (dipeptidyl peptidase IV, α -amylase, α -glucosidase) (Lacroix et Li-Chan, 2014a,b). L'effet insulinothrompique des composés dérivés du lait a été particulièrement attribué aux peptides dérivés du lactosérum (Oseguera-Toledo *et al.*, 2014).

La réponse observée chez l'humain avec divers hydrolysats de lactosérum est probablement due aux acides aminés libres et à la composition des peptides. A titre d'exemple, la présence de la leucine a montré une forte activité insulinothrompique (Geerts *et al.*, 2011). Cette dernière est associée à l'absorption intestinale des acides aminés libres (Leu, Ile, Phe, Arg, Tyr, Thr, Val, Ala, et Lys) et à certains dipeptides (Ile-Leu, Leu-Leu, et Val-Leu) et probablement aussi aux peptides cycliques (Morifuji *et al.*, 2010). Le degré d'hydrolyse des protéines digérées déterminent le niveau d'acides aminés dans le plasma (Morifuji *et al.*, 2010).

Lacroix et Li-Chan, (2014b) ont identifié deux fragments LKPTPEGDL et LKPTPEGDLEIL de la β -Lg avec une forte action inhibitrice de la dipeptidyl peptidase IV (IC₅₀ = 45 et 57 μ M, respectivement) en utilisant la pepsine. Le tableau IX présente quelques séquences peptidiques à activité antidiabétique.

Tableau IX : Peptides antidiabétiques identifiés dans le lactosérum.

Séquence peptidique	Protéine source	Référence
WLAHKALCSEKLDQ	α -La f(104-117)	Lacroix et Li-Chan, (2014b)
LAHKALCSEKL	α -La f(105-115)	
LCSEKLDQ	α -La f(110-117)	
TKCEVFRE	α -La f(4-11)	
LKPTPEGDL	β -Lg f(46-54)	
LKPTPEGDLEIL	β -Lg f(46-57)	Power et al., (2014)
IPAVFKIDA	β -Lg f(78-86)	
IPAVFK	β -Lg f(78-83)	

1.2.5.4. Activité de complexation des minéraux

Les peptides dérivés du lactosérum après leur digestion protéolytique ont montré une capacité importante à complexer certains cations tels que le calcium, le fer et le zinc ([Caetano-Silva et al., 2015](#) ; [Chaud et al., 2002](#) ; [Zhao et al., 2015](#) ; [Zhou et al., 2012](#)). En raison de ce potentiel, ces peptides sont considérés comme une bonne alternative afin d'atténuer les problèmes associés aux déficiences en fer, calcium et zinc observées dans les cas d'anémie et d'ostéoporose et bien d'autres troubles métaboliques. La supplémentation en ces peptides est considérée comme l'un des meilleurs moyens pour remplacer la prise des sels minéraux qui présentent une faible biodisponibilité et un risque de promouvoir la formation des espèces réactive à l'oxygène, ainsi que l'endommagement de la muqueuse gastrique ([Chaud et al., 2002](#) ; [Wang et al., 2013](#)).

Par ailleurs, il a été rapporté que la charge nette, la longueur de la chaîne latérale et le groupement fonctionnel des acides aminés seraient directement liés au degré de complexation de ces peptides aux cations ([Reddy et Mahoney, 1995](#)). Les études ont montré que la complexation fer-peptide implique principalement les groupements carboxyles, mais aussi l'azote aminé de la lysine, l'azote du groupement guanidine de l'arginine et du groupement imidazole de l'histidine, ainsi que la glycine et la proline ([Storcksdieck et al., 2007](#)).

En outre, il a été établi que la présence de la Lys, Ala, et Phe à une certaine concentration permettait une bonne complexation des peptides au fer ([Kim et al., 2007](#)). De même, il a été observé que les groupements carboxyliques étaient parmi les principaux sites de complexation au fer dans les 28 séquences obtenues par l'hydrolyse de la β -Lg avec la pancréatine, ainsi que la présence des acides aminés Glu et/ou Asp dans toutes ces séquences.

[Zhao et al. \(2015\)](#) ont identifié un tripeptide Tyr-Asp-Thr complexant fortement le calcium avec une capacité de $79.5 \mu\text{g mg}^{-1}$ en indiquant que les principaux sites de complexation concernent l'atome d'oxygène, le groupement carbonyle et l'azote des groupements aminés ou iminés. Le [tableau X](#) présente quelques séquences peptidiques complexant les minéraux.

1.2.5.5. Activité antimicrobienne

Le lactosérum est une source riche en protéines et peptides antimicrobiens qui peuvent exercer une activité microbienne comparable à celle des antibiotiques. Les mécanismes d'action sont au moins basés sur la rupture de la membrane cellulaire des microbes. L'activité

microbienne est liée à la charge, la taille, la composition en acide aminés, la structure secondaire, l'hydrophobicité des peptides, etc. (Brandelli *et al.*, 2015).

Tableau X : Peptides complexant les minéraux identifiés dans le lactosérum.

Séquence peptidique	Protéine source	Référence
TPEVDDE	β -Lg f(125-131)	Caetano-Silva <i>et al.</i> , (2015)
VLDTDYK	β -Lg f(94-100)	
VEELKPTPEGDLEI	β -Lg f(43-56)	
FD	β -Lg f(136-137)	Zhao <i>et al.</i> , 2014
CKDDQNPH	α -La f(61-68)	Caetano-Silva <i>et al.</i> , (2015)
DDDLTDDI	α -La f(82-89)	

Les peptides de charge négative, dérivés de la β -Lg et la α -La ont montré une activité antibactérienne contre les bactéries Gram-positives et une faible activité sur les bactéries Gram-négatives (Pellegrini *et al.*, 1999 ; Pellegrini *et al.*, 2001).

Pellegrini *et al.* (2001) ont identifié quatre peptides (β -Lg f15-20, f25-40, f78-83 et f92-100) qui exercent une forte activité antimicrobienne contre les bactéries Gram-positives. Les mêmes auteurs ont démontré que la substitution de certains acides aminés au niveau de ces séquences a permis de montrer que les acides aminés basiques (Lys et Arg) jouent un rôle important dans la l'activité antimicrobienne de ces peptides. Le [tableau XI](#) regroupe quelques séquences peptidiques à activité antimicrobienne.

Tableau XI : Peptides antimicrobiens identifiés dans le lactosérum.

Séquence peptidique	Protéine source	Référence
IDALNENK	β -Lg f(84-91)	Demers-Mathieu <i>et al.</i> , (2013)
TPEVDDEALEK	β -Lg f(125-135)	
VAGTWY	β -Lg f(15-20)	
AASDISLLDAQSAPLR	β -Lg f(25-40)	Pellegrini <i>et al.</i> , (2001)
VLVLDTDYK	β -Lg f(92-100)	
IPAVFK	β -Lg f(78-83)	
EQLTK	α -La f(1-5)	
GYGGVSLPEWVCTTF/ ALCSEK	α -La f(17-31)S-S(109-114)	Pellegrini <i>et al.</i> , (1999)
CKDDQNPH/ISCDKF	α -La f(61-68)S-S(75-80)	

1.2.5.6. Activité opioïde

Les peptides opioïdes ont été observés au sein des protéines du lactosérum telles que la LF, β -Lg, α -La et la BSA (Belem *et al.*, 1999). Ces peptides sont appelés lactorphines en référence aux endorphines. Ils exercent leur activité à une concentration de l'ordre du micromolaire. La réponse physiologique observée dépend du récepteurs opiacés (μ , δ et κ) auxquels ils se lient au niveau du système nerveux central ou dans le tractus gastro-intestinal

([Maubois et Léonil, 1989](#)). La séquence des peptides opioïdes typique comporte à l'extrémité N-terminal les acides aminés Tyr-Gly-Gly-Phe ([Teschemacher et al., 1997](#)).

Il a été démontré que la α -lactorphine pouvait induire la sécrétion de la mucine ainsi que le gène d'expression de la mucine dans les cellules épithéliales du côlon humain en se liant au récepteur μ ([Martínez-Maqueda et al., 2012](#)). Un effet similaire a été observé avec les hydrolysats tryptiques de la β -Lg (β -lactorphine), probablement à travers une voie opioïde ([Martínez-Maqueda et al., 2013](#)). Les hydrolysats de lactosérum ayant une capacité de moduler la production de la mucine peuvent être prometteurs dans l'amélioration de la protection gastro-intestinale ([Brandelli et al., 2015](#)). Le [tableau XII](#) présente quelques séquences peptidiques à activité opiacée.

Tableau XII : Peptides opioïdes identifiés dans le lactosérum.

Séquence peptidique	Protéine source	Référence
YGLF	α -La f(50-53)	Pihlanto-Leppälä, (2001)
YLLF	β -Lg f(102-105)	

1.2.5.7. Activité immunomodulatrice

De plus en plus d'investigations suggèrent l'existence de peptides immunomodulateurs dans la séquence primaire des protéines du lait et du lactosérum en particulier. Les peptides dérivés du lactosérum peuvent améliorer les fonctions des cellules immunitaires. Ceci peut être vérifié en mesurant la prolifération des lymphocytes, la synthèse d'anticorps et la régulation des cytokines ([Gill et al., 2000](#)).

Une hydrolyse théorique de la β -Lg et de l' α -La réalisée avec la trypsine ou la chymotrypsine a été conduite afin d'évaluer les propriétés immunomodulatrices des peptides libérés. Les peptides dérivés de la β -Lg f(15-20), f(55-60), f(84-91), f(92-105), f(139-148), f(142-148), et de l' α -La f(10-16) ont stimulé la prolifération des lymphocytes à différents degrés. Par contre, les peptides β -Lg f(15-20), f(55-60) et f(139-148) ont induit divers effets inhibiteurs et/ou stimulateurs de la sécrétion des cytokines ([Jacquot et al., 2010](#)). Ces résultats confirment que l'hydrolyse de la β -Lg et l' α -La par les enzymes digestives peut générer des peptides dotés d'un potentiel qui influence la réponse immunitaire spécifique à travers la modulation de la prolifération des splénocytes et la sécrétion des cytokines ([Brandelli et al., 2015](#)). Le [tableau XIII](#) présente quelques séquences peptidiques à activité immunomodulatrice identifiées dans le lactosérum.

Tableau XIII: Peptides immunomodulateurs identifiés dans le lactosérum.

Séquence peptidique	Protéine source	Référence
YG	α -La f50-51	Berthou et al., 1987
YGG	α -La f18-20	
GLF	α -La f51-53	Xu, 1998

1.2.6. Applications industrielles des peptides bioactifs

A l'heure actuelle il existe un nombre important de peptides à activités biologiques. Cependant, seulement un nombre restreint de peptides est produit à l'échelle industrielle. Cette limitation est due, d'une part, au manque de technologies appropriées à une grande échelle (Korhonen, 2002 ; Kitts et Weiler, 2003 ; Pouliot *et al.*, 2006 ; Korhonen et Pihlanto, 2007b) et, d'autre part, au fait que peu de peptides identifiés ont subi avec succès la validation clinique (Jauhiainen et Korpela 2007). Par ailleurs, les techniques de nanofiltration et d'ultrafiltration sont actuellement utilisées au niveau des industries afin de produire des peptides bioactifs. Ces derniers sont déjà utilisés comme ingrédients dans différentes préparations telles que les boissons fruitées et laitères et dans les produits de confiseries et les gommes à mâcher (Murray et FitzGerald, 2007 ; Erdman *et al.*, 2008 ; Saito, 2008).

De plus, des produits contenant des peptides antihypertenseurs, anticariogéniques, etc. sont actuellement commercialisés. Dans la plupart des études considérant l'humain comme modèle, un effet modéré ou une réduction significative de la pression artérielle est observée après consommation des hydrolysats ou des produits laitiers fermentés. Les tripeptides antihypertenseurs β -CN (Val-Pro-Pro) et κ -CN (Ileu-Pro-Pro) commercialisés sous les noms Calpis et Evolus, respectivement sont les plus étudiés (Takano, 2002 ; Seppo *et al.*, 2002). Il est à noter que la majorité des peptides commercialisés sont issus de l'hydrolyse des caséines, vu l'abondance de ces dernières et leur facilité relative à la coupure enzymatique pour générer des peptides bioactifs.

MATERIEL ET METHODES

II. MATERIEL ET METHODES

Le présent travail a été réalisé grâce à la collaboration de plusieurs laboratoires de recherches :

Lb A- Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB), Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Algérie ;

Lb B- Laboratoire de Qualité des Aliments et Chimie des Produits Naturels, Institut Agronomique Méditerranéen de la Canée, Grèce

Lb C- Laboratoire de Réactions et Génie des Procédés, Axes Bioprocessus-Biomolécules, Nancy, France.

Aussi le matériel listé ci-après est domicilié dans l'un de ces laboratoires, répertorié en recourant aux abréviations sus mentionnées (Lb A, B ou C).

2.1. Matériel

2.1.1. Appareillage

- Unité de chromatographie liquide de haute performance (HPLC sur C8 en phase inversée Shimadzu, Lb A) ;
- Unité de chromatographie liquide de haute performance couplée à la spectrométrie de masse en Tandem (Thermo Scientific Fisher, Lb B) ;
- Unité de chromatographie liquide de haute performance (HPLC) en phase inversée couplée à un spectromètre de masse Orbitrap ID-X Tribrid (Thermo Scientific, Lb C) ;
- Unité d'électrophorèse sur mini cuves verticales (Hoeffer SE 200, Bio-Rad ; Lb A et Lb B) ;
- Spectrophotomètre UV-Visible (Schott, Lb B ; Shimadzu, Lb A) ;
- Lyophilisateur à plateaux (Telstar LyoQuest, Lb A) ;
- Centrifugeuse réfrigérée (max 28 000xg ; Sigma, Lb A) ;
- Bain d'huile thermostaté (Velp Scientifica, Lb B) ;
- Sonicateur: (35kHz, Bandelin electronic, Lb A) ;
- Autres matériels nécessaires : balance de précision à 0.01 mg (Denver Instrument, balances analytiques à affichage digital (0.01 g ; Denver Instrument) ; pH mètre (Hanna instruments) ; bain-Marie (Mettler) ; agitateurs variés, etc.

2.1.2. Matériel biologique

2.1.2.1 Feuilles d'olivier

Les feuilles d'olivier *Olea europaea*. de la variété Koroneiki ont été collectées manuellement du jardin de l'Institut Agronomique Méditerranéen de la Canée, Grèce. Les feuilles ont été séchées au four à 50°C pendant 24 h jusqu'à stabilisation de la masse, ensuite elles ont été broyées dans un mixeur et tamisées jusqu'à obtention de particules de taille inférieure à 180 microns. La poudre de feuilles d'olivier a été conservée dans un flacon hermétiquement fermé à température ambiante pour les analyses ultérieures.

2.1.2.2 Echantillons de lait

Les échantillons de lait bovin utilisés dans le cadre de cette étude proviennent de la région Tizi Ouzou et sont collectés en période hivernale. D'autres échantillons de différentes espèces (caprine, ovine et cameline) sont été également utilisés en guise de comparaison.

2.1.2.3 Enzymes et standards

Nous avons eu recours aux enzymes protéolytiques suivantes pour obtenir les hydrolysats :

- alpha chymotrypsine (EC 3.4.21.1) : issue de pancréas bovin (firme : Merck) ;
- pepsine (EC 3.4.23.1) : issue d'estomac de porc (firme : Fluka) ;
- trypsine (EC 3.4.21.4) : issue de pancréas bovin (firme : Fluka).

L'Albumine Sérique Bovine (BSA) commerciale (Fischer Scientific) et l'acide gallique ont été utilisés comme standards pour les dosages respectifs des protéines et des polyphénols.

Tandis que l'hydroxytyrosol (> 98%), le tyrosol (98%), l'oleuropéine (> 89%), la rutine ($\geq 99\%$) et la lutéoline-7-O-glucoside ($\geq 98\%$) ont été utilisés comme étalon interne en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

Des protéines étalons ont été utilisées comme marqueurs de poids moléculaire en électrophorèse en PAGE-SDS. Il s'agit de : l'Albumine sérique bovine (67 kDa), l'Ovalbumine (45 kDa), la β -Lactoglobuline (18 kDa) et l' α -Lactalbumine (14 kDa).

2.1.3. Produits et réactifs spécifiques

Une gamme assez large de produits chimiques et de réactifs relativement spécifiques nous a permis de réaliser nos investigations. Nous citerons ci-après les principaux d'entre-eux :

Tris (hydroxyméthyl) aminométhane, acrylamide, N, N, N', N' tétraméthyléthylène diamine (TEMED), dodécyl sulfate de sodium (SDS), glycine, acide 2,4,6-trinitrobenzensulfonique (TNBS), bis-acrylamide, bleu de Coomassie G-250, Folin, néocuproïne, L-Arginine (> 98%), L-Cystéine, L-Lysine (> 98%), L-Proline (> 99%), réactif de Folin Ciocalteu.

2.2. Méthodes

2.2.1. Etude relative aux polyphénols des sous-produits oléïcoles

2.2.1.1. Synthèse des solvants eutectiques profonds (DESs)

Les solvants eutectiques profonds (DESs) sont synthétisés suivant la méthodologie décrite par (Cunha *et al.*, 2018). Le glycérol (donneur d'hydrogène, HBD) est mélangé séparément avec trois acides aminés (lysine, proline et arginine), accepteurs d'hydrogène (HBA), à différents rapports molaires ($R_{\text{mol}}^{\text{D/A}}$), afin d'atteindre le rapport (HBD/HBA) optimal. Les mélanges sont chauffés à 70°C sous une agitation de 500 rpm jusqu'à formation d'un liquide parfaitement transparent. Les (DESs) sont contrôlés continuellement pour leur stabilité et formation de cristaux durant une période d'au moins 30 jours.

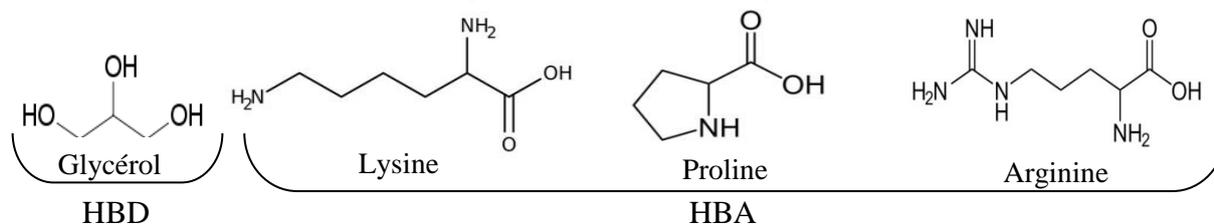


Figure 22: Structures du donneur d'hydrogène (HBD) et des accepteurs d'hydrogènes (HBA) des DESs synthétisés.

2.2.1.2. Extraction des polyphénols et optimisation du processus

L'effet des facteurs ($R_{L/S}$), (C_{DES}) et (T) sur le rendement d'extraction des polyphénols est étudié en utilisant le plan expérimental Box–Behnken (BBD) de la méthodologie des surfaces de réponses (Bezerra *et al.*, 2008). Le plan Box-Behnken répond à un critère d'optimisation particulier soit pour maximiser ou minimiser un phénomène donné. Dans ce plan les niveaux de variables sont situés au milieu des arrêtes de chaque côté du cube (Figure 23). Ce plan est constitué de 15 essais dont trois représentent les points centraux. Chaque facteur requiert trois niveaux (Box et Behnken, 1960).

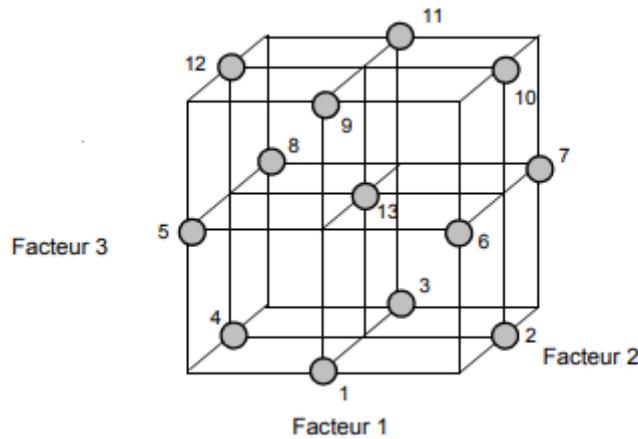


Figure 23 : Plan Box-Behnken pour trois facteurs (Goupy, 2006).

Les niveaux des variables sélectionnées ($R_{L/S}$), (C_{DES}) et (T), désignées respectivement X_1 , X_2 , X_3 , sont présentés analytiquement dans le tableau XIV. Les variables sont codées à trois niveaux : -1 (limite inférieure), 0 (moyenne) et $+1$ (limite supérieure), en se basant sur l'équation qui transforme la valeur réelle (Z_i) en une valeur codée (x_i) selon un plan expérimental défini.

$$x_i = \left(\frac{Z_i - Z_i^0}{\Delta Z_i} \right) \beta_d \quad (01)$$

Où ΔZ_i est la distance entre la valeur réelle au point central et la valeur réelle au niveau supérieur ou inférieur de la variable, β_d est la valeur majeure de la limite codée et Z_i^0 est la valeur réelle au point central.

L'intervalle des valeurs des trois variables est choisi en fonction des données de la littérature et le rendement en polyphénols totaux (R_{PT}) représente la réponse d'intérêt. L'analyse de variance (ANOVA) est utilisée pour évaluer la signification statistique des modèles mathématiques obtenus. De plus, la fonction de désirabilité de l'approche d'optimisation est appliquée pour déterminer les conditions optimales des variables qui atteindraient la désirabilité maximale du rendement d'extraction (R_{PT}).

Les modèles développés ont été sujets au test d'ajustement, qui est utilisé pour déterminer si les modèles sont adéquats pour décrire les données observées (Garg *et al.*, 2013). Le coefficient de corrélation (r^2) a aussi été utilisé afin d'indiquer le pourcentage de variabilité des paramètres d'optimisation expliqués par le modèle. Une valeur du (r^2) proche de l'unité montre un meilleur pouvoir prédictif du modèle (Yetilmezsoy *et al.*, 2009). En outre, la validité du

modèle statistique est déterminé par le degré du rapprochement de la valeur observée, obtenue dans les conditions optimales, de la valeur prédite du modèle développé (Joseph Davidson *et al.*, 2008).

Tableau XIV : Valeurs des variables indépendantes utilisées dans le plan d'expérience.

Variables indépendantes	Codes des variables	Niveaux des variables codées		
		-1	0	+1
$R_{L/S}$ (mL g ⁻¹)	X_1	50	100	150
C_{DES} (% w/v)	X_2	60	75	90
T (°C)	X_3	40	60	90

Pour chaque modèle pris en compte, les extractions sont réalisées avec un volume adéquat de solvant, selon les différents points du plan expérimental. L'expérimentation a consisté en une combinaison variée des trois facteurs étudiés, à savoir la concentration en eau (C_{DES}), les différents ($R_{L/S}$) et températures (T) telles que ces variables sont données par le plan expérimental. L'ensemble des extractions sont faites dans un bain d'huile ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) sous une agitation continue de 900 rpm pendant 150 min. En parallèle, une extraction sous des conditions optimales avec l'éthanol (70% ; v/v), le méthanol (70% ; v/v) et l'eau (100%) est aussi réalisée afin de comparer le taux des phénols totaux des (DESs) et celui obtenu avec les solvants conventionnels. La [figure 24](#) reprend les principales étapes suivies pour l'optimisation du rendement en polyphénols totaux (R_{PT}).

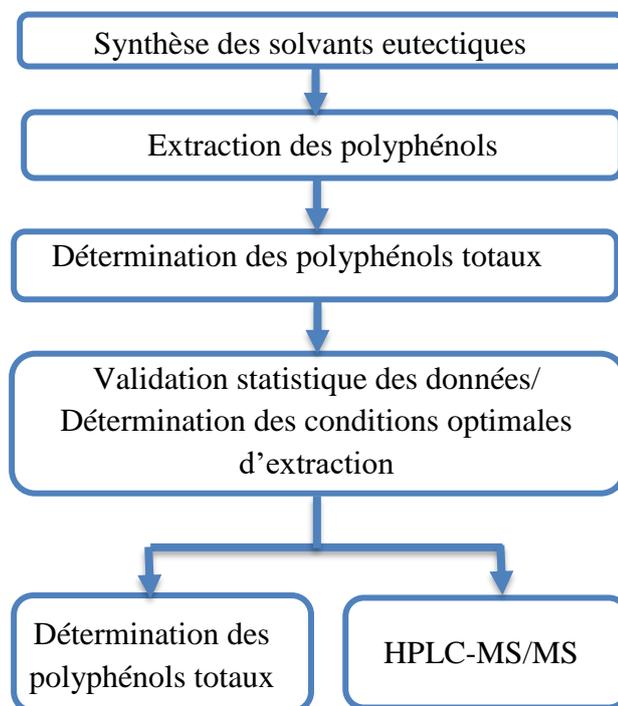


Figure 24: Schéma des principales étapes suivies pour l'optimisation du rendement en polyphénols totaux.

2.2.1.3. Détermination des polyphénols totaux

Le taux des polyphénols totaux (R_{PT}) a été déterminé en utilisant le réactif de Folin Ciocalteu. Le rendement est exprimé en mg d'équivalents d'acide galliques (GAEs) par gramme de masse sèche. Une partie aliquote constituée de 0.78 mL d'eau distillée, 0.02 mL d'échantillon et de 0.05 mL du réactif de Folin Ciocalteu a été mélangée. Après exactement 1 min, 0.15 mL de carbonate de sodium est ajouté (20%, w/v). Ensuite le mélange est placé à l'obscurité pendant 60 min et l'absorbance est lue à 750 nm. La concentration des phénols totaux (C_{PT}) est calculée en recourant à la courbe étalon (Figure 25). Le rendement en polyphénols totaux est déterminé en mg équivalent d'acide gallique (GAEs) par g de masse sèche en appliquant l'équation suivante :

$$R_{PT} \text{ (mg GAE g}^{-1} \text{ ms)} = \frac{C_{PT} \times V}{m} \quad (02)$$

où V est le volume du milieu extracteur et m, C_{TP} sont respectivement la masse de la matière d'étude (g) et la concentration des phénols totaux (mg L⁻¹) (Karakashov *et al.*, 2015).

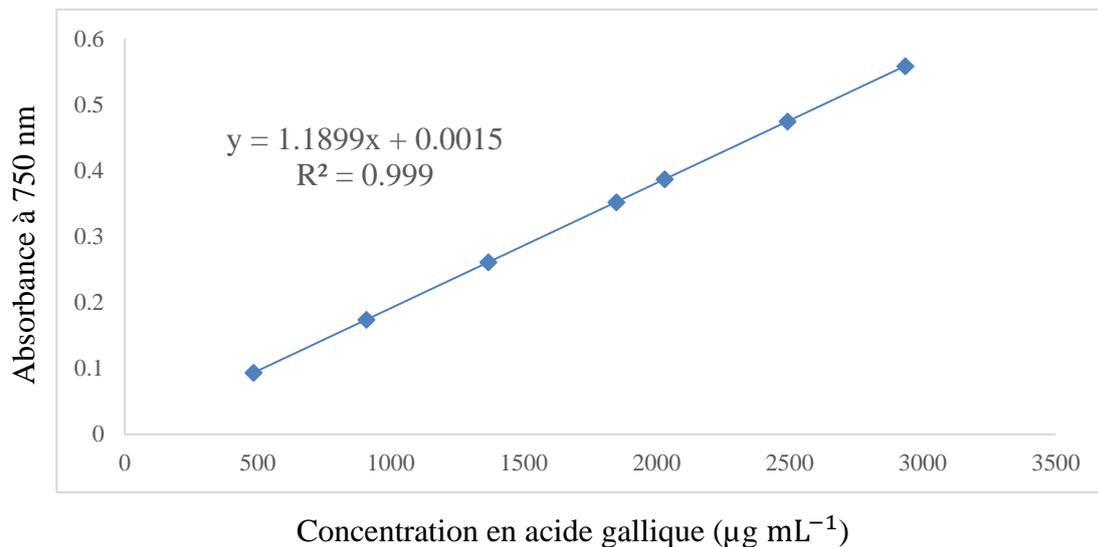


Figure 25 : Courbe étalon du dosage des phénols totaux en utilisant l'acide gallique comme standard.

2.2.1.4. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)

La séparation et l'analyse qualitative et quantitative de molécules biologiques de faibles poids moléculaires, telles les polyphénols, nécessitent l'utilisation de techniques comme la chromatographie liquide à hautes performances (HPLC), qui sont sensibles, résolutes, reproductibles et se faisant en un laps de temps réduit.

Pour cela, nous avons séparé nos échantillons sur une RP-HPLC en utilisant une C18 (125 mm × 2 mm, 4 µm). L'unité de chromatographie est couplée à un spectromètre de masse (Figure 26). Cette unité est menée d'un détecteur TSQ Quantum Access MS/MS, couplé à une pompe surveyor LC (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA.). L'élution est conduite à 40 °C en utilisant deux solutions : (A : eau ; acide acétique 1%) et (B : méthanol ; 1% acide acétique),

avec un gradient linéaire (0 min, 5% B ; 35 min, 100% B). Le débit d'écoulement est 0.3 mL min⁻¹.

Les spectres de masse ont été obtenus avec un mode d'ionisation négatif à une température du capillaire de 300°C, une pression de 30 (unité arbitraire), pression de gaz auxiliaire de 15 (unité arbitraire) et une pression de collision de 1.5 mTorr. La quantification des étalons utilisés (l'oleuropéine, l'hydroxytyrosol, le tyrosol, la lutéoline-7-O-glucoside et la rutine) est réalisée via une courbe de calibration externe en utilisant l'intensité de fragment la plus élevée produite durant la dissociation de collision induite (DID) du précurseur, l'ion moléculaire sélectionné (Tableau XV).



Figure 26 : Photographie de l'appareillage de chromatographie en phase liquide couplé à un spectromètre de masse (LC-M/MS) (Thermo Scientific Fisher).

Tableau XV : Courbes de calibration et intensités de dissociation des fragments par collisions induites.

Composé	Equation de la courbe de calibration externe	Coefficient de corrélation	Ion moléculaire	Fragment d'ion 1	Fragment d'ion 2
			M-1	(quantificateur)	(qualificatif)
Oleuropéine	$Y = 4920.6x + 109.162$	$r^2 = 0.9957$	539	275	377
Hydroxytyrosol	$Y = 425.38x - 1387.8$	$r^2 = 0.9994$	153	122.2	123.2
Tyrosol	$Y = 197.8x - 5810.1$	$r^2 = 0.9992$	137	106.2	119.1
Lutéoline-7-O-glucoside	$Y = 8567.3x + 10782$	$r^2 = 0.9996$	447	284	285
Rutine	$Y = 13,579.286x + 100,080.787$	$r^2 = 0.9984$	609	300	270.9

2.2.2 Etude relative aux protéines du lait

2.2.2.1. Isolement des protéines sériques totales

A partir du lait frais de collecte issu des différentes espèces mentionnées plus haut, nous procédons tout d'abord à un écrémage à 3500x g pendant 20 min, à 4°C, en prenant au préalable le soin de porter le lait à environ 30°C au bain-Marie pendant quelques minutes, sous agitation douce, afin de mieux solubiliser la matière grasse. Après centrifugation, la matière grasse est écartée et le lait est acidifié selon les cas : à pH 4.6 (lait bovin et ovin), à pH 4.3 (lait camelin) et à pH 4.2 (lait caprin), en utilisant une solution d'acide chlorhydrique 4N.

Après avoir écarté délicatement le culot de centrifugation formé par les caséines, le surnageant contenant les protéines sériques est recueilli et son pH est porté à la neutralité par ajout d'une solution d'hydroxyde de sodium 2N. Cette opération est répétée trois fois afin de s'assurer de la pureté du lactosérum. Ce dernier est par la suite dialysé en utilisant des membranes ayant un seuil de coupure de 8 kDa, contre de l'eau distillée à 4°C pendant 48 h, avec changement de bain trois fois par jour. Les échantillons dialysés sont congelés à (-40°C), en couches peu épaisses dans des coupelles. Ils sont ensuite lyophilisés et conservés sous cette forme jusqu'à leur utilisation ultérieure (Figure 27).

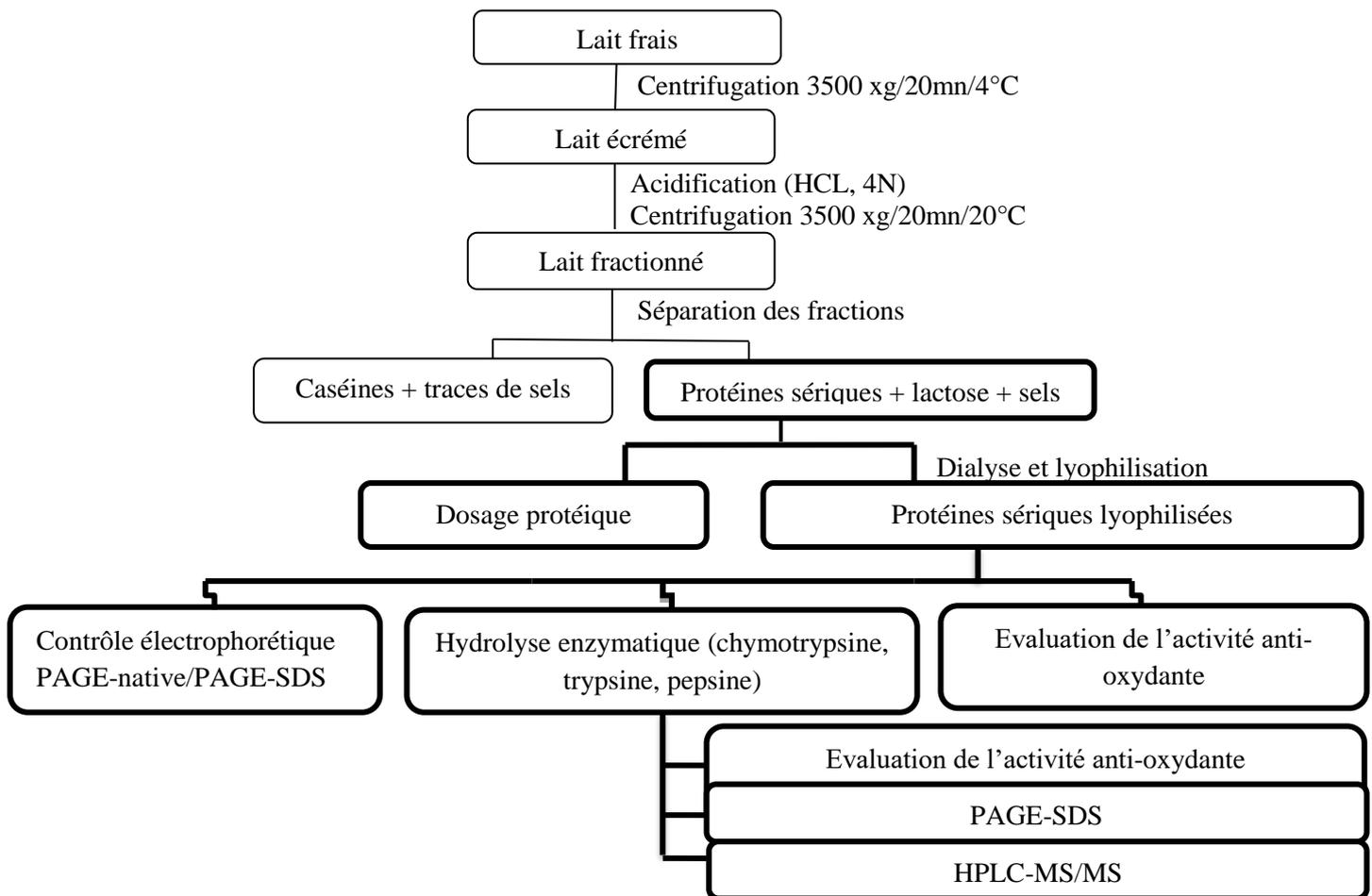


Figure 27 : Etapes d'isolement des protéines sériques et les analyses ultérieures appliquées sur cette fraction.

2.2.2.2 Dosage des protéines

La détermination de la concentration en protéines est réalisée avec la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Cette méthode colorimétrique est la plus communément utilisée pour l'estimation de la quantité des protéines dans les échantillons biologiques. De plus, une bonne corrélation est établie avec la méthode Kjeldahl dans le cas des protéines du lait. Le principe de la réaction est basé sur une réaction de Biuret qui donne naissance à un complexe cuivrique coloré dans un milieu alcalin, ainsi qu'une réduction du réactif de Folin-Ciocalteu par les noyaux phénoliques de la tyrosine, tryptophane, cystéine et histidine.

La teneur en protéines sériques est déterminée en utilisant la sérum albumine bovine (BSA) comme standard (Figure 28).

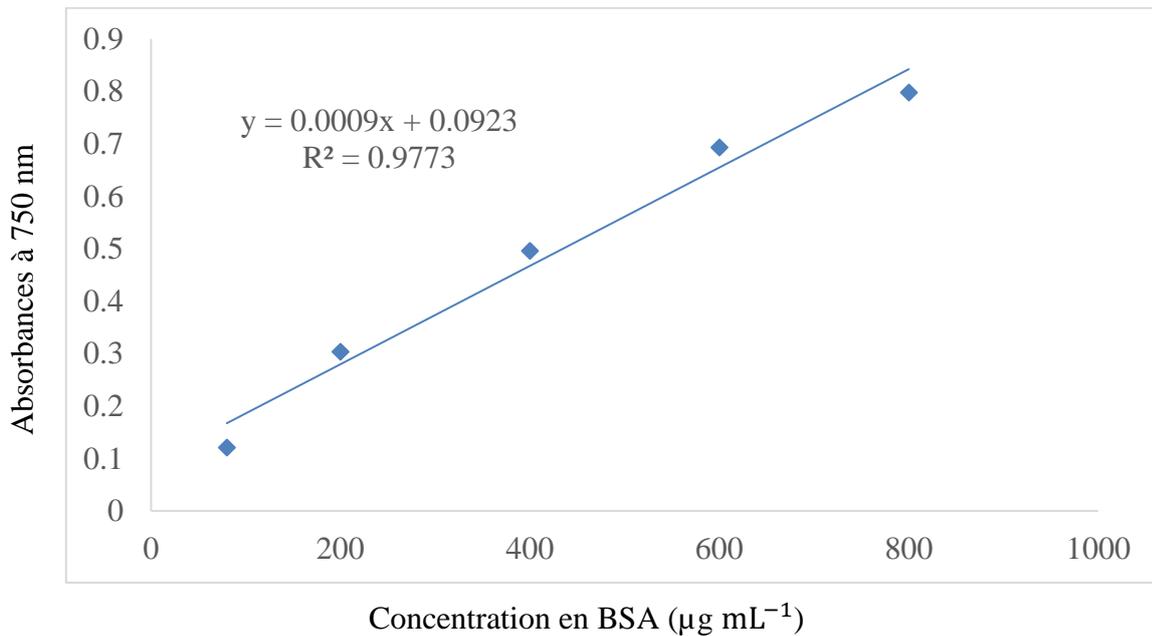


Figure 28 : Courbe étalon du dosage des protéines avec la méthode de Lowry *et al.* (1951) en utilisant la BSA comme standard.

2.2.2.3. Préparation des hydrolysats des protéines sériques bovines

L'hydrolyse des protéines sériques est réalisée dans un tampon phosphate pH 8.0 pour la chymotrypsine (EC 3.4.21.1 ; 350 U mg^{-1} activité protéique) et la trypsine (EC 3.4.21.4 ; 1645 U mg^{-1} activité protéique). Cependant pour la pepsine, un tampon de chlorure de potassium au pH 2.0 (EC 3.4.23.1 ; 1936 U mg^{-1} activité protéique) est utilisé. Le lactosérum est incubé avec les enzymes à différents ratios molaires afin d'atteindre le ratio optimal enzyme/substrat (v/v). La réaction enzymatique est réalisée à 37°C pendant 24 h.

L'hydrolyse combinée avec les trois enzymes est également réalisée dans le but de miner certaines étapes du tractus digestif. Ainsi, l'action de pepsine est combinée à celle de la chymotrypsine de manière séquentielle, de même que pour la pepsine avec la trypsine. En outre, la chymotrypsine est aussi combinée avec la trypsine dans hydrolyse simultanée. Dans le modèle combiné incluant la pepsine, l'hydrolyse est arrêtée après 2 h par ajustement du pH à 8.0 en utilisant l'hydroxyde de sodium 3N, afin de continuer l'hydrolyse soit avec la

chymotrypsine ou bien avec la trypsine. L'hydrolyse avec la combinaison chymotrypsine/trypsine est réalisée pendant 24 h sans interruption, car les deux enzymes s'opèrent au même pH.

Après incubation, les réactions enzymatiques sont arrêtées en chauffant à 100°C pendant 3 min. Les hydrolysats sont centrifugés à 1000xg pendant 10 min à 10°C. Le surnageant est utilisé pour les mesures de cette étude, à savoir l'activité anti-oxydante et le degré d'hydrolyse.

2.2.2.4. Processus d'hydrolyse enzymatique des protéines sériques bovines et plans expérimentaux

Un plan factoriel complet est utilisé afin d'étudier l'effet du temps de sonication appliqué comme prétraitement aux protéines sériques avant l'hydrolyse enzymatique et le ratio enzyme/substrat ($E:S$) sur l'activité enzymatique, en utilisant la chymotrypsine, la trypsine et la pepsine de façon séparée. Les plans factoriels peuvent être complets ou fractionnaires. Un plan factoriel complet consiste à réaliser toutes les combinaisons possibles des facteurs et des niveaux. Dans les plans factoriels complets, le nombre total d'expérimentation pour un nombre de facteur k à deux niveaux est 2^k . Ainsi, pour deux facteurs et trois niveaux nous aurons 3^2 essais pour notre plan (Jiju, 2014).

Par ailleurs, un plan Box-Behnken est utilisé pour l'étude de l'effet de trois facteurs dans le cas de l'hydrolyse enzymatique séquentielle. Outre le prétraitement et le ratio $E:S$ (v/v), le taux en pourcentage de chacune des enzymes composant la combinaison enzymatique ($E_1:E_2$) (v/v %) est utilisé comme troisième facteur dans les modèles de l'hydrolyse enzymatique combinée à savoir : (pepsine/chymotrypsine), (pepsine/trypsine), et chymotrypsine/trypsine).

Les niveaux de variables indépendantes sélectionnées : temps de sonication, ($E:S$), ($E_1:E_2$) désignées X_1, X_2, X_3 respectivement, sont présentés analytiquement dans le [tableau XVI](#).

L'intervalle des valeurs des trois variables est choisi sur la base des données de la littérature et l'activité anti-oxydante mesurée par la méthode CUPRAC représente la réponse d'intérêt. L'analyse de variance (ANOVA) est utilisée pour évaluer la signification statistique des modèles mathématiques obtenus. De plus, la fonction de désirabilité de l'approche d'optimisation est appliquée pour déterminer les conditions optimales des variables qui atteindraient la désirabilité de la valeur CUPRAC.

Les modèles ajustés ont été sujets au test d'ajustement, qui est utilisé pour déterminer si les modèles sont adéquats ou non pour décrire les données observées (Garg *et al.*, 2013). Le coefficient de détermination (r^2) a aussi été utilisé afin d'indiquer le pourcentage de variabilité des paramètres d'optimisation expliqués par le modèle. Une valeur du (r^2) proche de l'unité montre un meilleur pouvoir prédictif du modèle (Yetilmezsoy *et al.*, 2009). En outre, la validité du modèle statistique est déterminé par le degré du rapprochement de la valeur observée obtenue dans les conditions optimales de la valeur prédite du modèle développé (Joseph Davidson *et al.*, 2008).

L'hydrolyse est réalisée au bain-Marie selon le plan expérimental de chaque modèle. Les échantillons de lactosérum dépourvus de tout ajout enzymatique ont été utilisés comme contrôles dans les mêmes conditions des points expérimentaux.

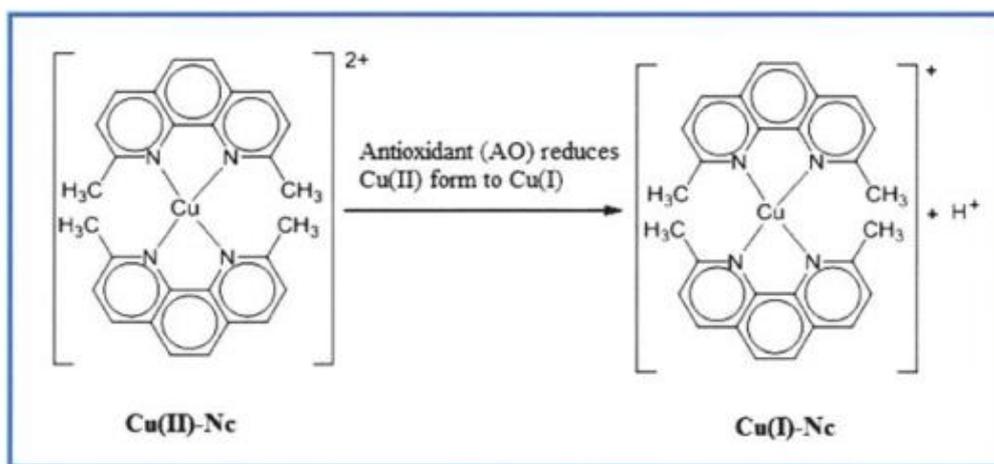
Tableau XVI : Valeurs des variables indépendantes utilisées dans le plan d'expérience.

Variables indépendantes	Codes des variables	Niveaux des variables codées		
		-1	0	+1
Temps de sonication (min)	X1	10	25	40
E:S (v/v %)	X2	2	2.5	5
E ₁ :E ₂ (v/v %)	X3	30	50	70

2.2.2.5. Evaluation de l'activité anti-oxydante des hydrolysats des protéines sériques bovines avec la méthode CUPRAC

L'activité anti-oxydante a été évaluée par la méthode CUPRAC (CuPric Reducing Antioxydant Capacity). C'est une méthode colorimétrique basée sur un principe de transfert d'électron. Elle consiste à mesurer l'absorbance du complexe Cu(I)-néocuproïne (Nc) formé lors de la réaction redox des antioxydants avec le réactif CUPRAC (Cu(II)-Nc) (Figure 29).

Il a été rapporté que seules les méthodes CUPRAC et ABTS sont capables de mesurer de manière simultanée les antioxydants de nature lipophile et hydrophile avec la même précision. Cette propriété est attribuable au fait que les chromophores de deux méthodes sont solubles à la fois dans le milieu aqueux et les solvants organiques (Özyürek *et al.*, 2008). D'autre part, le test de DPPH serait plus approprié aux antioxydants lipophiles extraits avec les solvants organiques. Quant aux méthodes au Folin et FRAP, elles sont plus appropriées aux antioxydants solubles dans les solutions aqueuses et les solutions aqueuse-alcooliques (Apak *et al.*, 2007).

**Figure 29** : Chromophore de la réaction CUPRAC (Özyürek *et al.*, 2011).

L'activité anti-oxydante des différentes fractions d'hydrolysats des protéines sériques est mesurée en triplicata suivant la méthodologie de Çekiç *et al.* (2009). Un mélange de chlorure de cuivre dihydraté (0.01 M), néocuproïne (0.0075 M), d'échantillon hydrolysé et un tampon tris pH 7.0 à un rapport de 1:1:1:2 a été incubé à une température ambiante pendant 30 min à l'obscurité. Le tampon utilisé est composé de 0.086 M de tris, 0.09 M glycine, 4 mM

citrate, 5% SDS et 8 M urée. Une courbe étalon de cystéine 0.8 mM est utilisée afin d'obtenir les valeurs CUPRAC (Figure 30). L'absorbance est lue à 450 nm.

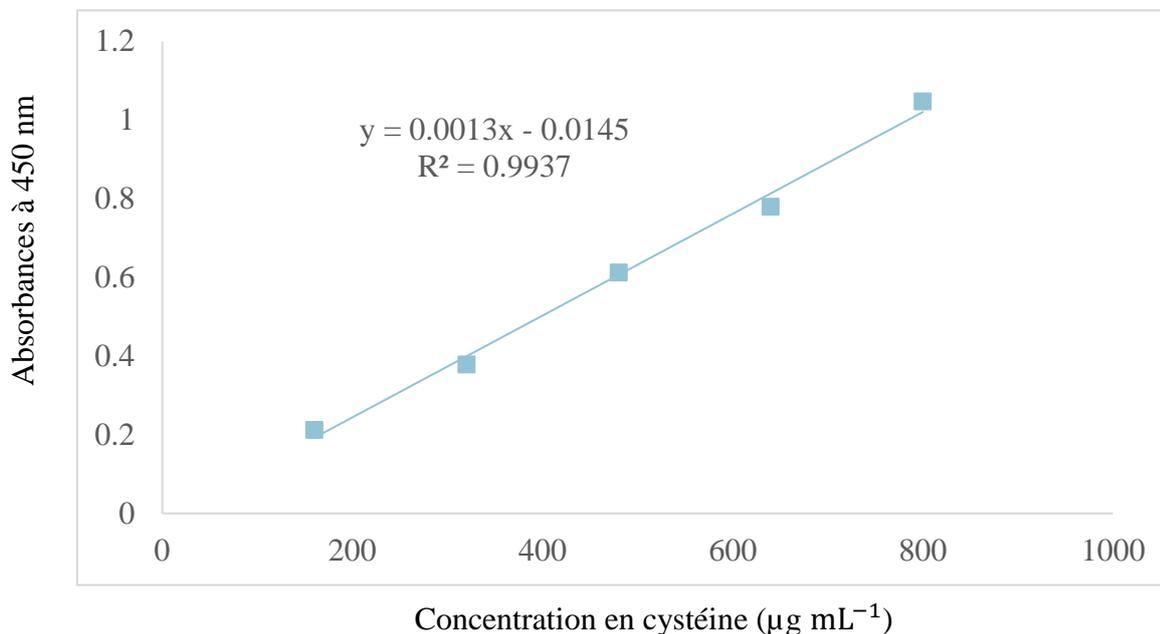


Figure 30 : Courbe étalon du dosage des peptides/acides aminés antioxydants des hydrolysats en utilisant la cystéine comme standard.

2.2.2.6. Degré d'hydrolyse enzymatique des hydrolysats des protéines sériques bovines avec la méthode au TNBS

Le degré d'hydrolyse (DH) est défini comme le pourcentage des liaisons peptidiques clivées par rapport au nombre total des liaisons peptidiques durant l'hydrolyse enzymatique (Adler-Nissen, 1986a). Il existe diverses méthodes pour la détermination du (DH) telles que la méthode du pH-stat, la titration au formol, les méthodes spectroscopiques (ninhydrine, O-phthaldialdéhyde (OPA), l'acide 2,4,6-trinitrobenzenesulfonique (TNBS) (Nnanna *et al.*, 2007). La méthode du pH-stat est basée sur le nombre de protons libérés durant l'hydrolyse. Les méthodes des titrations au formol, TNBS, OPA sont basées sur la mesure du groupement aminé généré pendant l'hydrolyse qui est quantifiable par spectrophotométrie. La figure 31 illustre un exemple de réaction entre le TNBS avec une amine primaire.

Une comparaison entre ces méthodes a permis de mettre en évidence des avantages et inconvénients pour chacune de ces méthodes. Cependant, il a été montré l'existence d'une bonne corrélation entre la méthode OPA et la méthode au TNBS (Panasiuk *et al.*, 1998).

Dans notre présente étude, nous avons utilisé la méthode au TNBS pour sa convenance relative en terme de reproductibilité. Les groupements d'acides aminés primaires sont déterminés dans chaque hydrolysats en utilisant le test à l'acide trinitrobenzenesulfonique (TNBS) décrit par Adler-Nissen (1979).

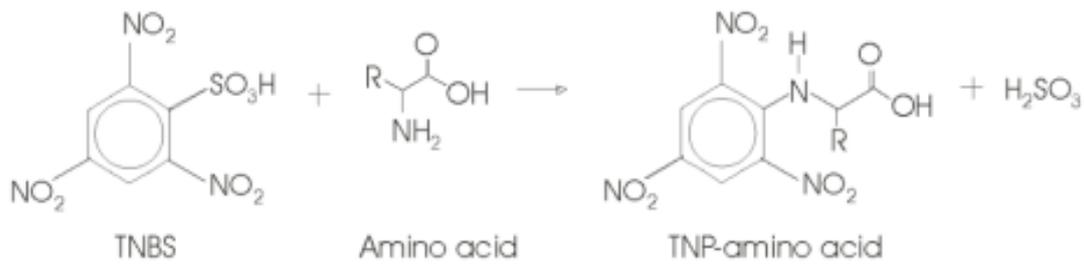


Figure 31 : Réaction de l'acide 2,4,6 trinitrobenzensulfonique avec un acide aminé (Rutherford, 2010).

L'échantillon et le TNBS 0.01% sont dissous chacun dans un tampon de bicarbonate de sodium 0.1 M (pH 8.5) qui sont ensuite dissous à un rapport de 2:1 (500 μ L échantillon :250 μ L TNBS), puis incubés à 37°C pendant 2 h à l'obscurité. La réaction est arrêtée par ajout de 250 μ L de SDS 10% et 125 μ L HCL 1M. L'absorbance est lue à 340 nm. La formule suivante est utilisée pour le calcul du degré d'hydrolyse :

$$\text{DH (\%)} = 100(\text{AN}_1 - \text{AN}_2) / \text{Npb}$$

où AN₁ et AN₂ sont les contenus en azote aminé des protéines avant et après hydrolyse (mg g⁻¹ protéine), respectivement, et Npb est le contenu d'azote des liaisons peptidiques des protéines (mg g⁻¹). Les valeurs de AN₁ et AN₂ sont obtenues à partir de la courbe étalon de la L-glycine mg L⁻¹ à 340 nm (Figure 32). Ces valeurs ont été divisées par la teneur en protéine des échantillons de lactosérum pour avoir les masses (mg) d'acide aminé par g de protéine.

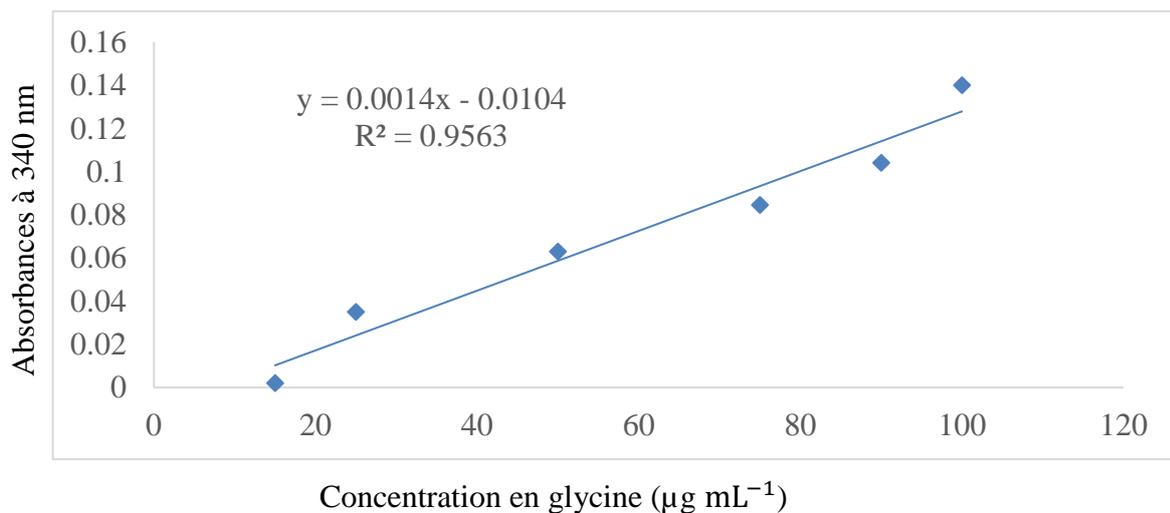


Figure 32 : Courbe étalon du dosage des groupements amines libres en utilisant la glycine comme standard.

2.2.2.7. Méthodes électrophorétiques

L'électrophorèse est une technique consistant à faire migrer les protéines dans un gel sous l'influence d'un champ électrique, permettant ainsi leur séparation. Les protéines se déplacent soit vers l'anode ou la cathode en raison de leur caractère amphotère, pouvant être visualisées sous forme de bandes de migration.

La séparation des protéines est réalisée sur un gel de polyacrylamide (PAGE) pour son pouvoir de tamis moléculaire attribuable à sa structure particulière. Le gel de polyacrylamide est formé par polymérisation des monomères d'acrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) et de bis-acrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$). La réaction de polymérisation est catalysée par un générateur de radicaux libres composé de persulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) et de N,N,N,N-tetraméthylènediamine (TEMED) (Fritsch et Krause, 2003).

2.2.2.7.1. Comportement Electrophorétique des protéines en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-native)

Dans les conditions non dissociantes et non dénaturantes des protéines, la migration électrophorétique se fait en fonction de leur charge et leur poids moléculaire. Il est établi que ces conditions sont appropriées aux protéines de forme globulaire tel est le cas des protéines sériques du lait.

Nous avons adopté la méthode de Hillier *et al.* (1976). Le gel de polyacrylamide (T : 12%, C : 2.7%) est coulé sur un système de mini cuve en plaques verticales (Hoefer SE 200 et SE 280, U.S.A). Le tampon de gel (pH 8.9) est composé de Tris/HCl. Le tampon d'électrodes (pH 8.3) est constitué de Tris (5 mM), glycine (77 mM).

Les échantillons de protéines sériques, à l'état lyophilisé (1 mg mL^{-1}) sont dissous dans le tampon de gel et le glycérol (50%), puis sont déposés dans les puits à raison de $5 \mu\text{L}$ à $10 \mu\text{L}$. La migration électrophorétique est réalisée à 250 V, 20 mA, 4 W à température ambiante pendant environ 60 min.

2.2.2.7.2. Comportement Electrophorétique des protéines en PAGE-SDS

L'utilisation du dodécylsulfate de sodium (SDS) permet une migration des protéines en fonction de leur taille, puisque cet agent anionique donne une charge négative aux protéines en se fixant sur les zones hydrophobes ce celles-ci. Cette fixation est rendu possible grâce à l'utilisation d'un agent réducteur, le β -mercaptoéthanol qui assure la rupture des liaisons disulfures à une température élevée 100°C .

Le gel d'électrophorèse sur polyacrylamide en présence de sodium dodécylsulphate est réalisé sur un système de mini gel vertical tel qu'il a été décrit par Laemmli (1970), avec quelques modifications ajoutées. Les gels de polyacrylamide sont préparés par co-polymérisation de l'acrylamide et du bis-acrylamide en utilisant le TEMED et le persulfate d'ammonium. Le gel de séparation à 12% d'acrylamide (pH 8.8) est composé de Tris-HCL (1.5 M) et du SDS (10%). Le gel de concentration à 4% d'acrylamide (pH 6.8) contient du Tris-HCL (0.5 M) et du SDS (10%)

Un milligramme d'échantillon lyophilisé est dissous dans $800 \mu\text{L}$ de tampon composé de Tris-HCL (0.5 M ; pH 6.8), du SDS (10%), de l'eau distillée et du β -mercaptoéthanol, respectivement dans un rapport (2:1:1:0.2). Après chauffage de l'échantillon à 100°C pendant 4 à 5 min et refroidissement, $200 \mu\text{L}$ de glycérol (50%) et du bleu de bromophénol sont rajoutés

et homogénéisés parfaitement avant le remplissage des puits. Le tampon d'électrode (pH 8.3) est composé de Tris-HCl (0.25 M), de glycine (1.92 M) et du SDS (10%).

L'électrophorèse est réalisée, à température ambiante, en une heure à 200 V et 20 mA. Les gels sont colorés pendant 1 heure dans une solution de décoloration contenant du bleu de Commassie R-250 dissous dans un mélange d'acide acétique (5%), du méthanol (1 volume) et de l'eau distillée (1 volume). Pour le calibrage moléculaire du gel, des marqueurs de protéines standards préparés au laboratoire LABAB ont été utilisés. Il s'agit de l'Albumine sérique bovine (67 kDa), l'Ovalbumine (45 kDa), la β -Lactoglobuline (18 kDa) et l' α -Lactalbumine (14 kDa).

2.2.2.8. Analyse des peptides par chromatographie liquide à haute performance en phase inversée couplée à un spectromètre de masse

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sur colonne en phase inverse permet de séparer les constituants d'un mélange en fonction de leur caractère hydrophobe. La phase stationnaire est principalement composée de silice greffée par des groupements hydrophobes, le plus souvent des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C-8 et C-18). La phase mobile est un solvant polaire. Ainsi, les composés sont élués dans l'ordre de leur hydrophobie croissante. La détection en sortie de colonne est réalisée par mesure d'absorbance en UV (Smith, 1984).

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui permet la détermination des masses moléculaires des composés analysés ainsi que leur identification et quantification. Le principe de cette technique est basé sur la séparation et la détection des ions formés suite à l'ionisation des molécules à analyser. En fonction de l'information recherchée la source d'ionisation peut être de plusieurs types telles que l'électronébulisation ou électrospray (ESI), la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI), le couplage plasma inductif (ICP), la désorption-ionisation sur silicium (DIOS), etc. (Domon, 2006).

Les hydrolysats protéiques de cette étude sont analysés sur un système UHPLC-HRMS (Thermo Scientific) composé d'une unité de chromatographie liquide (VanquishTM) reliée à un détecteur à barrette de diodes (PDA) et à un spectrophotomètre Orbitrap ID-XTM Tribrid de haute résolution opérant au mode d'ionisation électrospray (ESI).

Les peptides ont été séparés à 30°C en utilisant une colonne C18 (Thermo ScientificTM AcclaimTM 120) avec un débit d'éluion de 200 $\mu\text{L min}^{-1}$. La phase mobile est constituée de la solution A (eau avec l'acide formique à 0.1%) et de la solution B (acétonitrile et acide formique à 0.1%). Après un lavage de la colonne avec la solution B (95%) et une étape d'équilibration pendant 15 min avec la même solution (5%), les peptides sont élués en 40 min, en utilisant un gradient de 5 à 50% de la solution B.

L'analyse des masses est réalisée en mode ESI positif (ESI⁺) dans les conditions suivantes : le voltage du spray à 3.5 kV ; les gaz « sheath », « auxiliary » et « sweep » sont fixés à 35, 7 et 10 (unité arbitraire units.min^{-1}), respectivement ; la température du vaporisateur et le tube du transfert d'ion à 300°C.

La calibration du spectromètre de masse est réalisée en utilisant une solution Thermo Scientific PierceTM FlexMixTM. Les données obtenues de la spectrométrie de masse sont traitées avec le logiciel Xcalibur v. 3.0 (Thermo Scientific). De plus, un autre logiciel "Compound

Discoverer™ metabolomics v. 3.3 (Thermo Scientific) a permis la détection automatique des masses peptidiques dans les hydrolysats protéiques.

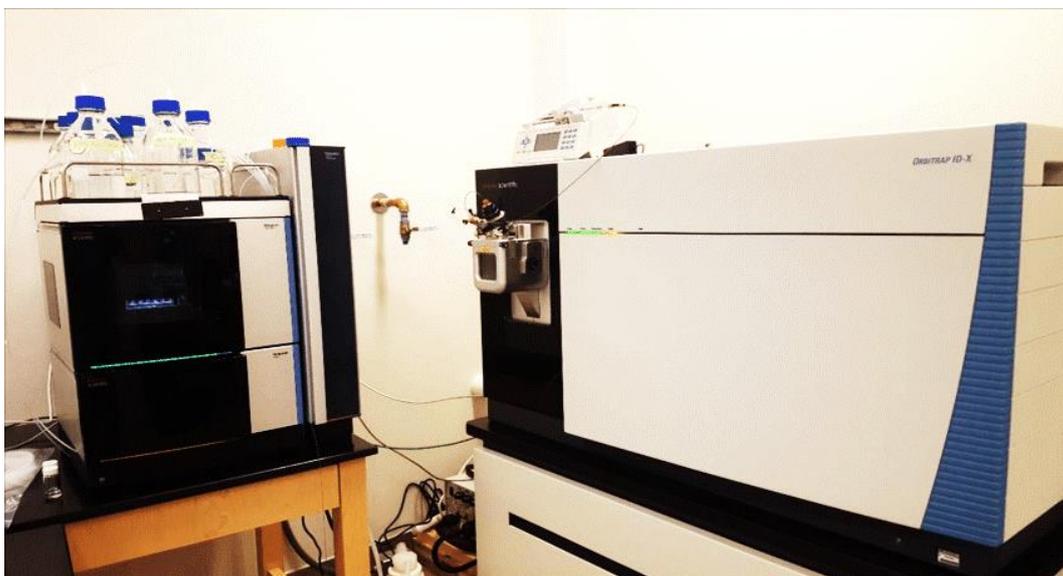


Figure 33: Photographie de l'appareillage Orbitrap ID-X Tribrid (Thermo Scientific).

2.2.3. Analyses statistiques

L'ensemble des extractions et hydrolyses ont été réalisées deux fois et toutes les analyses ont été répétées au moins trois fois. Les valeurs utilisées sont le résultat des moyennes calculées. Le plan expérimental et les statistiques de la surface des réponses ont été réalisés sur JMP™ Pro 13 (SAS, Cary, NC, USA). Les régressions linéaires et non linéaires ont été réalisées avec Sigma Plot™ 12.0 à un seuil de signification d'au moins 95% ($p < 0.05$).

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 1 : Les sous-produits oléicoles : extraction des polyphénols par utilisation des solvants eutectiques profonds et évaluation de l'activité anti-oxydante

Dans ce chapitre, nous avons abordé, d'une part, la synthèse des nouveaux solvants eutectiques profonds à base de glycérol et, d'autres parts, l'optimisation des conditions d'extraction des polyphénols issus des feuilles d'olivier avec ces solvants. Nous avons aussi essayé d'établir une comparaison entre l'efficacité d'extraction des polyphénols obtenus avec les solvants eutectiques profonds et celle utilisant les solvants conventionnels. Enfin, nous nous sommes intéressés à comparer le rendement d'extraction des polyphénols obtenu avec les différents sous-produits oléicoles sous les conditions optimales.

3.1. Synthèse des solvants eutectiques profonds (DESs)

La synthèse des DESs utilisés est précédée par une série d'essais de criblage qui comporte différents ratios molaires de donneurs et d'accepteurs d'hydrogène. Les mélanges glycérol-acides aminés ont été testés avec différents dans un intervalle de 1:1 à 11:1. Les DESs sont préparés en les chauffant à 70°C pendant 60 min sous une agitation de 500 rpm.

Les résultats de cette préparation montrent que les ratios testés ont abouti à des mélanges miscibles et transparents pour les combinaisons glycérol-lysine (GL-Lys) et glycérol:proline (GL-Pro). Néanmoins, l'utilisation des ratios $R_{\text{mol}}^{\text{D/A}}$ (3:1) et (5:1) n'a pas permis d'avoir un solvant transparent dans le cas de la combinaison glycérol-arginine. Par contre, les ratios $R_{\text{mol}}^{\text{D/A}}$ (7:1), (9:1) et (11:1) ont été adéquats pour un mélange miscible (Figure 34).

Afin de choisir le ratio $R_{\text{mol}}^{\text{D/A}}$ dans cette étude, différentes extractions ont été réalisées et le rendement en polyphénols totaux est considéré pour les trois DESs étudiés.



Figure 34 : Photographies des solvants eutectiques profonds (constitués de glycérol et d'arginine) prises à différents ratios molaires.

Les extractions sont réalisées à une concentration du solvant DES (C_{DES}) (70%, w/v) et un ratio liquide/solide ($R_{\text{L/S}}$) de 40 mg mL⁻¹ sous des conditions de chauffage à 50°C et une

agitation à 500 rpm pendant 150 min. Le choix du $R_{\text{mol}}^{\text{D/A}}$ est basé sur le taux le plus élevé en polyphénols ([Tableau XVII](#)).

Ainsi, le solvant GL-Arg est synthétisé à un ratio molaire donneur / accepteur d'hydrogène (HBD:HBA ; 7:1). Par contre, les solvants GL-Lys et GL-Pro sont préparés à un ratio HBD:HBA (3:1). Par conséquent, l'effet du ratio molaire pourrait constituer une variable explicative des résultats obtenus vu que l'homogénéité des conditions n'est pas totalement satisfaite pour tous les DESs. Notons que les ratios $R_{\text{mol}}^{\text{D/A}}$ inférieurs à ceux utilisés dans cette étude forment des mélanges cristallisés, notamment dans le cas du GL-Arg. Signalons aussi que des mélanges peu pratiques sont observés dans le cas des solvants GL-Lys et GL-Pro en raison de leur viscosité élevée.

Tableau XVII : Rendement en polyphénols totaux avec les différents ratios en utilisant les solvants eutectiques profonds et les solvants conventionnels.

Solvant	Ratio molaire (HBD:HBA)	polyphénols totaux (mg GAE g ⁻¹)
GL-Lys	3:1	66.24
	5:1	59.43
	7:1	59.22
GL-Arg	11:1	50.24
	9:1	52.20
	7:1	54.66
Eau	-	21.03
Ethanol (70%)	-	46.16
Méthanol (70%)	-	45.81

3.2. Optimisation du processus d'extraction des polyphénols

Un plan Box-Behnken (BBD) est adopté afin d'étudier l'effet combiné des variables : ratio liquide/solide ($R_{L/S}$), concentration du solvant eutectique profond (C_{DES}) et température (T) sur le rendement en polyphénols totaux (R_{PT}) des extraits de feuilles d'olivier. L'expérimentation a fait l'objet de 15 essais constitués des différentes combinaisons de variables conçues par le plan expérimental. [Le tableau XVIII](#) présente le plan expérimental ainsi que les valeurs expérimentales et prédites pour les trois modèles étudiés GL-Lys, GL-Pro et GL-Arg.

Tableau XVIII : Plan Box–Behnken codé et non codé avec les données observées et prédites.

Expérimentation	Variables indépendantes			Rendement en polyphénols (R _{PT} , mg GAE g ⁻¹ ms)					
	<i>R_{L/S}</i>	<i>C_{DES}</i>	<i>T</i>	GL–Lys		GL–Pro		GL–Arg	
	(<i>X</i> ₁ , mL g ⁻¹)	(<i>X</i> ₂ , % w/v)	(<i>X</i> ₃ , °C)	Mesurées	Prédites	Mesurées	Prédites	Mesurées *	Prédites *
1	50(-1)	90(+1)	60(0)	124.58	123.65	78.59	79.84	80.860	78.680
2	100(0)	75(0)	60(0)	131.91	133.49	73.99	74.63	73.110	74.810
3	50(-1)	75(0)	40(-1)	101.50	100.40	61.87	62.28	70.100	72.610
4	150(+1)	75(0)	80(+1)	191.60	139.70	87.81	87.40	114.93	112.39
5	50(-1)	75(0)	80(+1)	146.70	144.40	79.21	77.80	95.530	96.930
6	150(+1)	90(+1)	60(0)	165.21	160.89	84.39	84.63	88.070	89.810
7	50(-1)	60(-1)	60(0)	92.370	96.700	67.45	67.20	75.960	74.230
8	100(0)	60(-1)	80(+1)	153.50	151.47	76.79	78.45	98.030	98.370
9	150(+1)	60(-1)	60(0)	146.00	146.93	78.86	77.61	74.910	77.100
10	100(0)	90(+1)	40(-1)	120.32	122.36	72.41	70.76	74.510	74.170
11	100(0)	60(-1)	40(-1)	114.00	110.77	59.77	59.61	67.400	66.600
12	100(0)	75(0)	60(0)	136.65	133.49	75.92	74.63	76.620	74.810
13	150(+1)	75(0)	40(-1)	136.26	138.60	66.48	67.89	72.620	71.140
14	100(0)	75(0)	60(0)	131.91	133.49	73.99	74.63	74.690	74.810
15	100(0)	90(+1)	80(+1)	177.54	180.79	86.80	86.96	107.16	107.96

*Données non transformées.

3.2.1. Validation des modèles mathématiques

La validation des modèles développées a tenu compte d'un certain nombre de paramètres statistiques tels que la normalité, le coefficient de détermination (r^2), la valeur p (p-value), le coefficient de variation, etc.

La distribution des données a été analysée dans le but de vérifier la présence d'observations aberrantes et la normalité des données à travers le test de Shapiro-Wilk. Le résultat de cette analyse n'a montré aucune observation aberrante. Cette distribution n'a été observée qu'avec les modèles GL-Lys et GL-Pro avec une p-value de 0.98 et 0.72, respectivement. Cependant, une valeur significative est obtenue dans le cas du modèle GL-Arg (p).

Par ailleurs, il a été rapporté que lorsque la normalité des données est absente, les coefficients estimés et les erreurs standards sont biaisés. Ce qui conduirait à des conclusions erronées au niveau des intervalles de confiance et des tests de significations (Glass *et al.*, 2012). Ainsi, afin d'assurer l'allure Gaussienne, les valeurs R_{PT} du modèle GL-Arg ont été sujettes à une transformation mathématique. L'un des objectifs statistiques d'avoir recours aux transformations de données réside en l'obtention de valeurs symétriques qui permet de conditionner et de faciliter l'analyse des données dans les étapes ultérieures (Tsai *et al.*, 2017).

Dans cette étude, les valeurs R_{PT} du modèle GL-Arg ont été converties via la transformation Box-Cox (Malaeb *et al.*, 1997 ; Asar *et al.*, 2014). La transformation se présente sous cette forme :

$$(\lambda) = \begin{cases} \frac{y^\lambda - 1}{\lambda}, & \text{si } \lambda \neq 0; \\ \log y, & \text{si } \lambda = 0. \end{cases} \quad (03)$$

Où Y est la valeur transformée. Le paramètre (λ) définit une transformation particulière. Il peut être une racine carrée quand $\lambda = 0.5$ ou un logarithme naturel quand $\lambda = 0$. La valeur optimale lambda est choisie dans l'intervalle $[-2; +2]$ avec des sauts de 1/10. Cette valeur est sélectionnée sur la base du plus faible écart type obtenu, ce qui correspond à une valeur $\lambda = 1.2$ (Ishak *et al.*, 2018). L'application de cette transformation a permis un test Shapiro–Wilk non significatif avec une p-value ($p = 0.095$), ce qui normalise les données et satisfait l'hypothèse du test. Toutes les analyses consécutives ont été réalisées sur les données transformées pour le modèle GL-Arg.

Une relation empirique exprimée par l'équation polynomiale du deuxième ordre avec les termes d'interaction est établie entre le plan expérimental et les variables utilisées sur la base du plan expérimental Box–Behnken. L'équation finale en terme de variables significative codées et leurs interactions est donnée dans le [tableau XIX](#).

Tableau XIX : Equations polynomiales et paramètres statistiques calculés après application du plan d'expérience.

DES	Equations polynomiales de deuxième ordre	r ²	p
GL-Lys	$R_{PT} = 133.49 + 10.22 X_1 + 21.86 X_2 + 24.78 X_3 + 10.04 X_3^2$	0.99	0.0002
GL-Pro	$R_{PT} = 74.63 + 4.91 X_1 + 3.80 X_2 + 8.76 X_3$	0.98	0.0006
GL-Arg	$R_{PT} = 0.83 + 2.64 \times 10^{-4} X_1 + 1.55 \times 10^{-4} X_2 + 9.06 \times 10^{-4} X_3 + 1.98 \times 10^{-4} X_2^2 + 4.36 \times 10^{-4} X_3^2$	0.99	0.0002

X_1, X_2, X_3 : effets principaux; ; effets quadratiques.

Ces modèles donnent des rendements d'extractions des polyphénols respectifs de 98% pour GL-Pro ($r^2=0.98$) et 99% pour GL-Lys et GL-Arg ($r^2=0.99$) et présentent de faibles erreurs aléatoires et erreurs quadratiques moyennes (RMSE) où RMSE=4.3927 pour GL-Lys, 1.7598 pour GL-Pro et 0.0001 pour GL-Arg. Par conséquent, ces résultats nous conduisent à conclure que les modèles développés sont hautement significatifs (Figure 35).

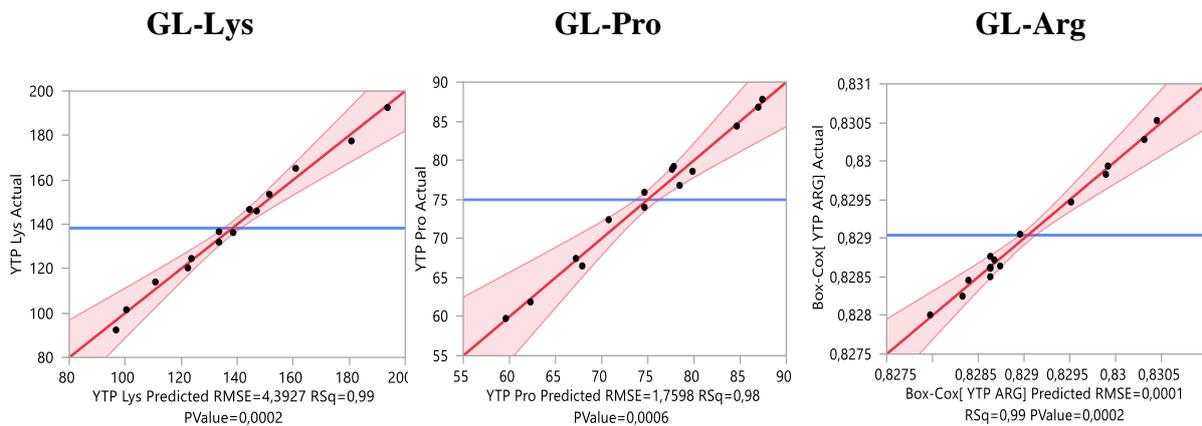


Figure 35 : Graphiques des valeurs observées en fonction des valeurs prévues des solvants eutectiques profonds présentant quelques paramètres statistiques.

Par ailleurs, la validité des modèles mathématiques est aussi vérifiée avec le test du manque d'ajustement. Ce test est utilisé pour détecter l'existence d'observations qui présentent une faible correspondance au modèle même dans le cas d'une significativité importante de la tendance générale (Bischoff et al., 2006). Le manque d'ajustement est non significatif quand un nombre limité d'observations se trouvent en dehors de la région ombragée de l'intervalle de confiance du graphique réel par prédiction (Figure 36).

GL–Lys

Défaut d'ajustement				
Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Défaut d'ajustement	3	81,505056	27,1684	3,6287
Erreur pure	2	14,974207	7,4871	Prob. > F
Erreur totale	5	96,479263		0,2235
				R carré max.
				0,9985

GL–Pro

Défaut d'ajustement				
Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Défaut d'ajustement	3	12,998925	4,33297	3,4867
Erreur pure	2	2,485431	1,24272	Prob. > F
Erreur totale	5	15,484356		0,2308
				R carré max.
				0,9975

GL–Arg

Défaut d'ajustement				
Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Défaut d'ajustement	3	4,59821e-8	1,5327e-8	0,8754
Erreur pure	2	3,50186e-8	1,7509e-8	Prob. > F
Erreur totale	5	8,10006e-8		0,5723
				R carré max.
				0,9958

Figure 36 : Résultats du test d’ajustement des solvants eutectiques profonds testés.

Dans cette étude, toutes les observations se localisent dans l’intervalle de la tendance générale. De plus, les r^2 obtenus pour GL–Lys ($r^2=0.9985$, $p=0.2235$) ; GL–Pro ($r^2=0.9958$, $p=0.5723$) ; et GL-Arg ($r^2=0.9979$, $p=0.2223$) indiquent que tous les modèles sont robustes.

Le coefficient de variation (CV) et le coefficient de corrélation entre les valeurs mesurées et les valeurs prédites sont déterminés afin d’évaluer la qualité d’ajustement des modèles. Les résultats (CV, %, 3.13 pour GL-Lys, 2.35 pour GL–Pro, et 0.01 pour GL-Arg) indiquent un faible CV, ce qui suggère une faible déviation entre les valeurs mesurées et les valeurs prédites (Ramí *et al.*, 2014). Les valeurs du CV et du r^2 obtenues sont une indication forte que les modèles développés présentent une fiabilité et une précision adéquates.

Les valeurs expérimentales mesurées sous les conditions optimales sont comparées aux valeurs prédites dans le [tableau XX](#). La valeur mesurée pour GL-Pro se situe dans l’intervalle des valeurs prédites. Cependant, les valeurs expérimentales obtenues sous les conditions optimales sont proches des valeurs prédites dans le cas des modèles GL–Lys et GL–Arg. Néanmoins, la faible différence entre les deux valeurs (expérimentale et prédite) dans ces deux cas n’a pas montré de signification pratique sur la qualité d’ajustement des deux modèles. Cette différence pourrait être due à une source incontrôlée de variation pendant le processus d’extraction (température, agitation, etc.) ou à des erreurs expérimentales mineures.

En considérant l'ensemble des paramètres statistiques de vérification des modèles mathématiques et les résultats obtenus, nous pouvons conclure que ces modèles mathématiques de prédiction sont valides et convenables pour l'optimisation des conditions d'extraction des polyphénols.

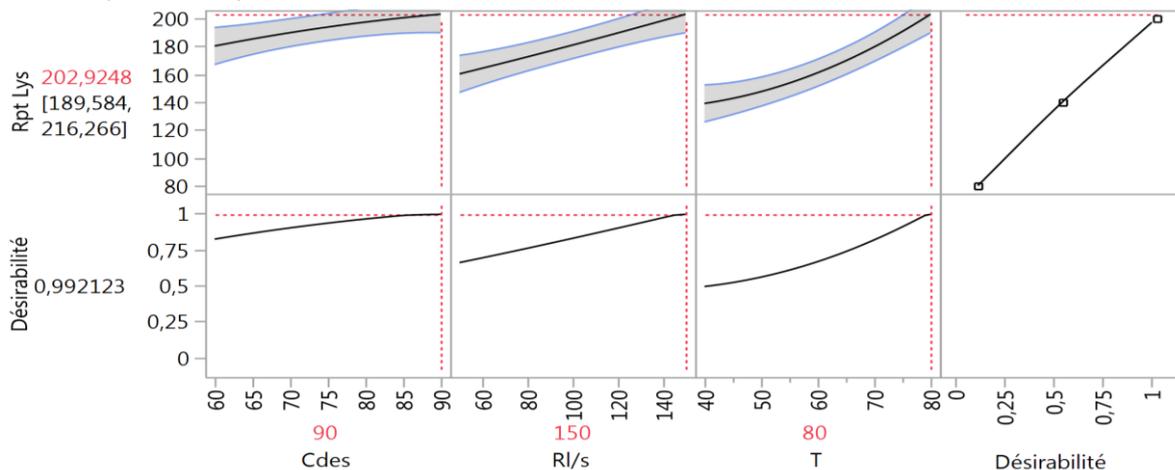
Tableau XX : Conditions optimales prédites et comparaison du rendement en polyphénols entre les valeurs expérimentales et prédites des DESs testés. Les extractions sont réalisées sous une agitation (900 rpm) pendant 150 min.

DES	Intervalle des valeurs prédites (mg g ⁻¹)	Valeurs observées* (mg g ⁻¹)	Conditions optimales		
			R _{L/S} (mL g ⁻¹)	C _{DES} (% w/v)	T (°C)
GL-Lys	[189.58, 21.27]	188.39 ± 0.37	150	90	80
GL-Pro	[86.31, 97.00]	95.97 ± 0.74	150	90	80
GL-Arg	[0.83053, 0.8313] ^a	0.83002 ± 0.47 ^a	150	90	80
	[112.48, 129.68] ^b	100.01 ± 1.98 ^b			

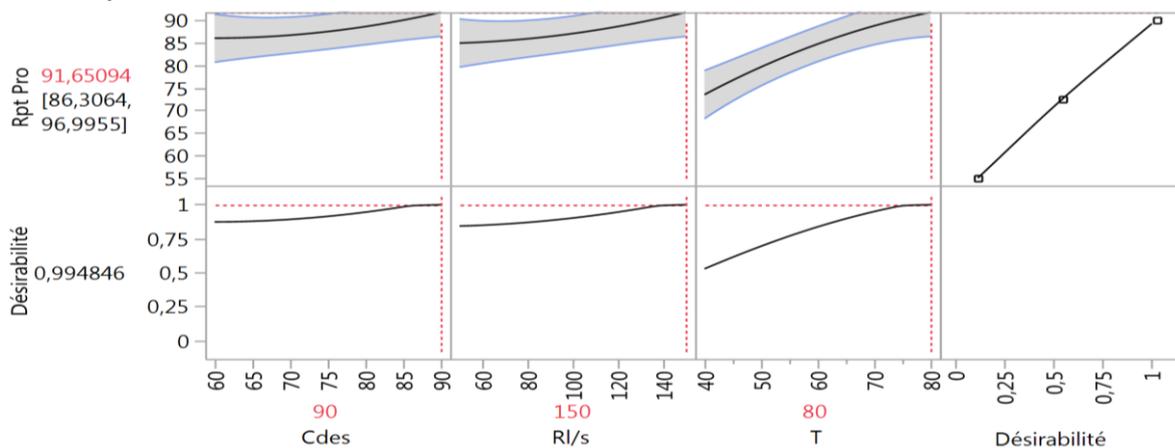
*moyenne écart type de trois déterminations. a : transformation Box-Cox des données ; b : données avant transformation.

De plus, le plan d'expérience a permis de détecter une signification statistique du coefficient quadratique X_3^2 (T) dans deux modèles, à savoir GL-Lys et GL-Arg ainsi que l'absence d'un effet croisé parmi les variables. En outre, les résultats obtenus montrent un effet significatif ($p < 0.05$) pour toutes les variables (X_1, X_2, X_3) sur le processus d'extraction des polyphénols. Ce résultat peut se visualiser à travers les évolutions des profils prédictifs, qui examinent les relations dynamiques entre les données et les résultats (Figure 37). Ces évolutions présentent un aspect général courbé qui illustre les réponses non linéaires des effets des modèles. L'augmentation observée dans chaque variable conduit à une augmentation dans la réponse dans les trois DESs testés.

A. Glycérol–Lysine



B. Glycérol–Proline



C. Glycérol–Arginine

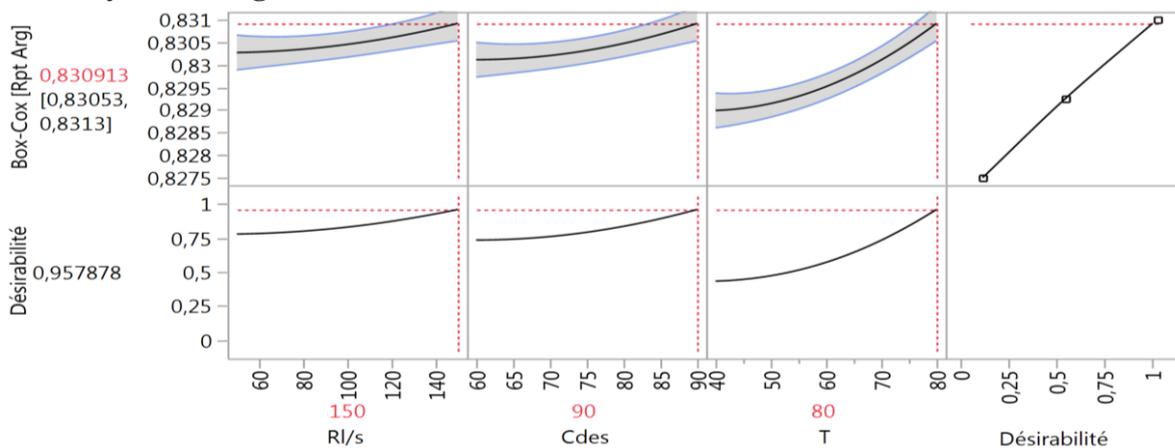


Figure 37 : Evolution des profils prédictifs présentant la désirabilité générale des solvants eutectiques profonds Glycérol–Lysine (A), Glycérol–Proline (B), et Glycérol–Arginine (C) avec les valeurs optimales des variables $R_{L/S}$, C_{DES} , et T .

3.2.2. Effet des facteurs étudiés sur le rendement des polyphénols extraits

En utilisant la fonction de désirabilité, la valeur R_{PT} désirée est atteinte sous un R_{LS} 150 mL g⁻¹, une C_{DES} 90%, w/v, et une T 80 °C avec tous les DESs étudiés. Notons que ces conditions permettent d'avoir une valeur maximale de désirabilité respective de 0.992, 0.995, et 0.958 pour GL-Lys, GL-Pro et GL-Arg. Les résultats de cette étude indiquent que les variables R_{LS} , C_{DES} et T affectent considérablement l'extraction des polyphénols issus des feuilles d'olivier. Ceci est en accord avec la littérature qui rapporte l'importance de ces variables dans l'extraction des polyphénols en général (Xia *et al.*, 2015).

3.2.2.1 Ratio liquide/solide

La variable R_{LS} montre un effet significatif élevé. Ceci est en accord avec les investigations précédentes qui ont rapporté une proportionnalité importante entre la matière végétale et le solvant dans les processus d'optimisation de l'extraction (Rakotondramasy-Rabesiaka *et al.*, 2010). Ce paramètre clé joue un rôle important dans le phénomène de diffusion qui définit en grande partie le cours de l'extraction et son rendement. Un rendement d'extraction élevé est souvent observé quand une grande proportion de phase liquide est utilisée. Cette dernière conduit à une saturation de la concentration et à une meilleure solubilisation des polyphénols (Katsampa *et al.*, 2015 ; Chakroun *et al.*, 2021).

Dans cette étude, la valeur optimale du R_{LS} (150 mL g⁻¹) est plus élevée que les valeurs rapportées par la littérature. Les valeurs du R_{LS} varient habituellement entre 10 et 45 mL g⁻¹ en utilisant les DESs. La valeur du R_{LS} obtenu est également plus élevée que celle des solvants conventionnels qui peut atteindre 120 mL g⁻¹ dans certaines investigations (Vetal *et al.*, 2013 ; Dedousi *et al.*, 2015). Les différences observées concernant la valeur optimale du R_{LS} peut être dues à la variation au niveau du solvant utilisé, aux conditions expérimentales de l'extraction (température, agitation, temps d'extraction, etc.), à l'intervalle choisi pour le R_{LS} ou encore à la source des polyphénols. Bien que l'objectif d'optimiser l'extraction des polyphénols soit commun, les différentes conditions d'extraction utilisées dans diverses études affectent la valeur optimale du R_{LS} et par conséquent la présente comparaison.

3.2.2.2. Concentration du DES

Tout comme le R_{LS} , la concentration du DES (C_{DES}) a montré un effet significatif important sur le rendement d'extraction des polyphénols issus des feuilles d'olivier. Le niveau optimal de la C_{DES} était le même avec les trois DESs de cette étude (90%, w/v). Ceci suggère que la quantité d'eau requise pour atteindre un rendement maximal est exactement la même pour trois DESs. L'addition d'eau au DESs est l'un des moyens de raffinement des propriétés physico-chimiques des DESs. Ainsi, l'ajustement de la quantité d'eau est capital pour affiner les propriétés des DESs telles que la viscosité et la polarité qui affectent de manière significative le rendement d'extraction (Dai *et al.*, 2016).

Des études récentes ont estimé une quantité d'eau optimale variant entre 10 et 50% (Dai *et al.*, 2013), qui peut même atteindre même 63.8% selon Jancheva *et al.* (2017). Il a été noté que l'addition d'eau aux DESs jusqu'à un certain point se situant au-dessus du point optimal,

pouvait affecter négativement le rendement de l'extraction, car une grande quantité d'eau peut entraîner la rupture des liaisons hydrogènes entre le HBD et le HBA (Dai *et al.*, 2015).

Nous observons dans cette étude une quantité d'eau optimale de 10% (v/v) pour tous les DESs utilisés. Autrement dit, les HBAs testés nécessitent la même quantité d'eau et les différences de structures ainsi que les propriétés physico-chimiques de la lysine, la proline et l'arginine n'ont pas affecté la polarité des DESs. Un tel résultat est plutôt contradictoire avec certaines informations publiées qui rapportent des quantités d'eau différentes en utilisant des chaînes d'HBAs de différentes longueurs. Il a été observé que plus la chaîne de l'HBA est longue, plus grande sera la quantité d'eau nécessaire (Slim *et al.*, 2018).

Par conséquent, la différence d'efficacité des trois DESs serait due à un autre facteur tel que le pH du milieu d'extraction (Ajila *et al.*, 2011). L'alcalinité conférée par les acides aminés assure un environnement plus ou moins alcalin qui peut ioniser les polyphénols et les rendre plus polaires et solubles dans les solvants. La lysine, la proline et l'arginine possèdent des pK_a égales à 10.57, 10.47 et 12.10, respectivement. En terme d'efficacité de solvant, le résultat attendu sur la base de l'explication donnée serait alors GL-Arg, puis GL-Lys et en dernier GL-Pro. Cependant, l'ordre obtenu était GL-Lys, GL-Arg et en dernier, GL-Pro, ce qui explique uniquement l'ordre obtenu pour GL-Lys et GL-Pro.

Ce résultat suggère l'existence d'un autre facteur important concernant le solvant GL-Arg. Il a été souligné que le $R_{mol}^{D/A}$ à un certain point pouvait favoriser l'extraction des polyphénols en raison de la diminution de la viscosité et la diffusivité élevée (Bi *et al.*, 2013). En conséquence, l'utilisation d'un $R_{mol}^{D/A}$ plus élevé dans le cas des solvants GL-Lys et GL-Pro s'avère évidemment d'une influence significative sur les processus d'optimisation d'extraction des polyphénols.

L'extraction sous les conditions optimales avec GL-Lys a abouti à un rendement de 54.83 et 40.32% supérieur à celui obtenu avec GL-Pro et GL-Arg, respectivement. En revanche, L'extraction réalisée avec GL-Arg a permis d'avoir un rendement de 24.32% supérieur à celui obtenu avec GL-Pro. Ce résultat suggère que le solvant GL-Lys est le plus efficace pour extraire les polyphénols. Ceci serait dû à la forte liaison hydrogène entre les polyphénols de la plante, indépendamment du $R_{mol}^{D/A}$ et de l'alcalinité (Fanali *et al.*, 2020 ; Rente *et al.*, 2021). Par voie de conséquence, nous pouvons conclure que les différences de rendement en polyphénols sont principalement attribuées aux liaisons hydrogènes des HBAs utilisés dans cette étude. Ainsi, l'affinement des propriétés physico-chimiques des HBAs pourrait être un indicateur important pour l'amélioration de l'extraction des polyphénols.

3.2.2.3. Température

Il a été rapporté qu'un effet favorable est observé avec la température sur l'extraction des polyphénols. En effet, une augmentation de la température conduit à un rendement plus élevé en polyphénols par amélioration de la solubilité et des réactions hydriques (Gironi *et al.*, 2011 ; Vergara-Salinas *et al.*, 2012). Ceci est en accord avec le résultat obtenu dans cette étude. Un effet significatif est observé avec tous les DESs utilisés à la même température optimale (80°C). Ces résultats montrent une similitude avec les conclusions de l'étude de Bucić-Kojić *et al.*,

(2007) qui ont obtenu un rendement d'extraction le plus élevé à 80°C. La figure 38 illustre l'effet des variables expérimentales sur le rendement d'extraction à travers une évolution des profils prédictifs de surface en 3D.

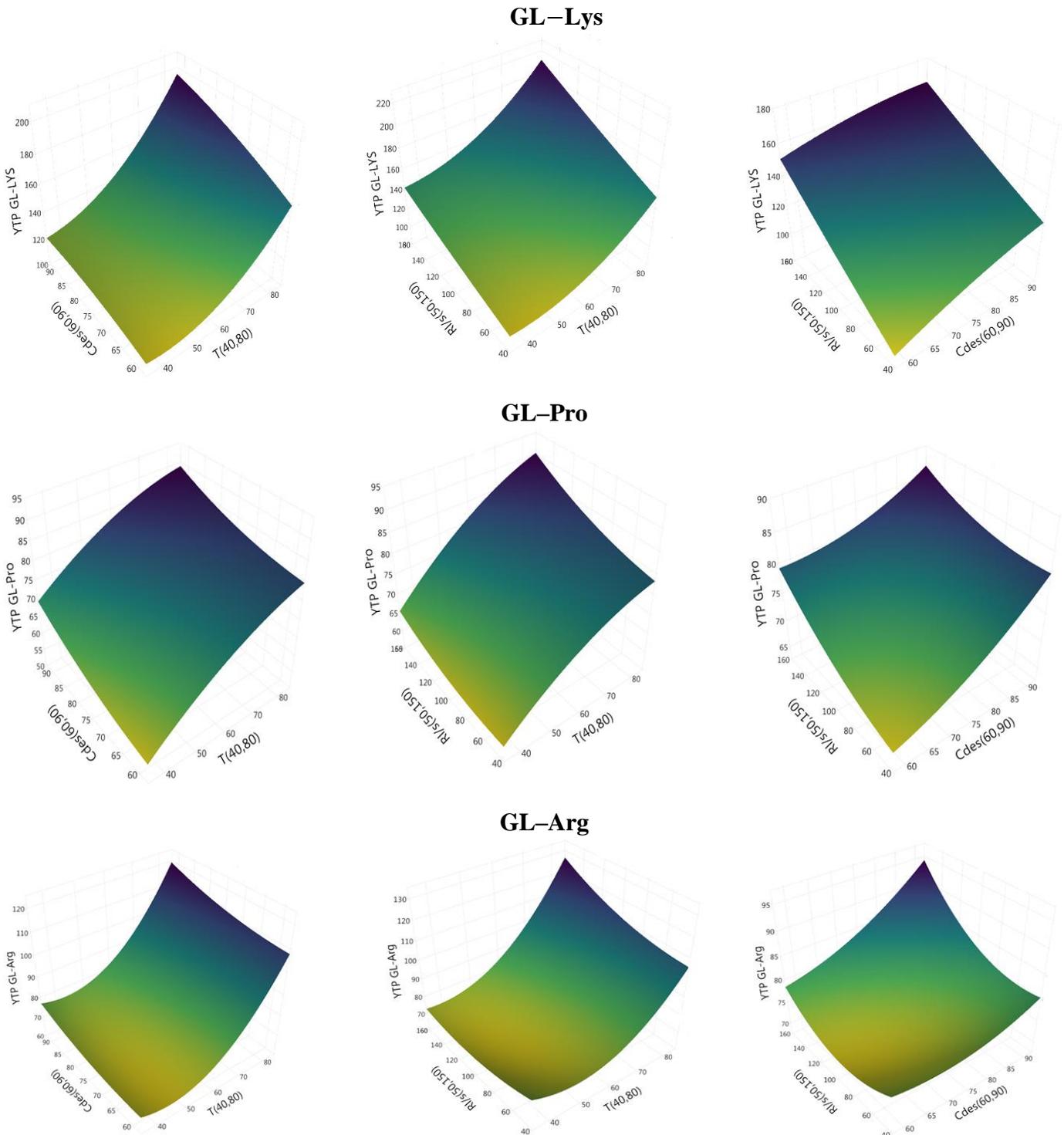


Figure 38 : Profils de surface en 3D présentant la variation simultanée des variables C_{DES} et T , $R_{L/S}$ et T , et $R_{L/S}$ et C_{DES} sur le rendement d'extraction avec les trois solvants eutectiques profonds.

En outre, d'autres investigations sur la cinétique décrivent une relation proportionnelle entre la diffusion et la température suivant la loi d'Arrhenius (Cacace *et al.*, 2003 ; Pedreschi *et al.*, 2009). Par contre il est signalé que le rendement d'extraction en polyphénols ainsi que leurs diversités sont plus atténués à des températures élevées et avec un temps d'exposition plus long (Ho *et al.*, 2008). Toutefois, ce niveau de température varie selon les auteurs en fonction des solvants d'extraction utilisés, du substrat de départ, etc. (Ho *et al.*, 2008).

3.3. Evaluation de l'activité anti-oxydante des polyphénols

Les polyphénols totaux sont déterminés après 150 min d'extraction. L'objectif de cette mesure est de comparer l'efficacité des DESs synthétisés. La teneur en polyphénols totaux dans tous les extraits obtenus avec les DESs est supérieure à celle des extraits obtenus avec l'éthanol (70%, v/v), méthanol (70%, v/v) et l'eau, dans les conditions optimales d'extraction (Figure 39).

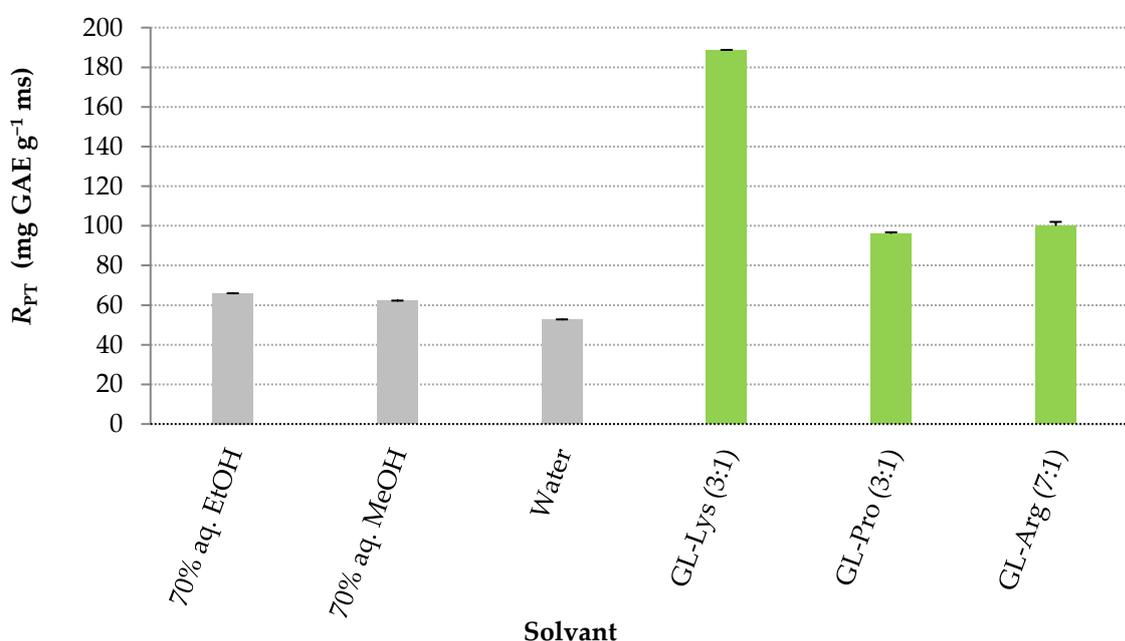


Figure 39 : Rendement d'extraction en polyphénols obtenus avec les solvants eutectiques profonds et les solvants conventionnels. Les extractions sont réalisées sous les conditions optimales ($R_{L/S} = 150 \text{ mL } g^{-1}$, $C_{DES} = 90\%$, $T = 80 \text{ } ^\circ\text{C}$) et agitation (900 rpm) pendant 150 min.

La comparaison entre les DESs utilisés renseigne sur le rendement optimal en polyphénols issus des feuilles d'olivier. Les résultats montrent une activité anti-oxydante plus importante dans le cas des DESs, sous les conditions optimales de $R_{L/S} = 150 \text{ mL } g^{-1}$, $C_{DES} = 90\%$, et $T = 80 \text{ } ^\circ\text{C}$. Les DESs utilisés ne sont pas de même efficacité face aux solvants conventionnels. En effet, le mélange GL-Lys s'avère être le solvant le plus efficace pour l'extraction des polyphénols contenus dans les feuilles d'olivier. Alors que le solvant GL-Arg est légèrement meilleur que le solvant GL-Pro. Les rendement en polyphénols R_{PT} obtenus sont évalués respectivement à 188.39, 100.01 et 95.96 $mg \text{ } g^{-1}$ équivalent d'acide gallique pour GL-

Lys, GL–Arg et GL–Pro, comparativement à ceux obtenus avec l'éthanol (65.95), le méthanol (62.27) et l'eau (52.97) mg g⁻¹ équivalent d'acide gallique.

L'extraction avec GL–Lys a permis d'obtenir des rendements d'extraction supérieurs de 64 % par rapport à l'utilisation de l'éthanol, 66.01% par rapport au méthanol et 71.09% par rapport à l'eau. Ces écarts indiquent l'efficacité remarquable du solvant GL–Lys comparée aussi bien, à celle des autres DESs, que des solvants conventionnels. Ce résultat est en accord avec la littérature où un meilleur potentiel d'extraction est rapporté avec les DESs (Kottaras *et al.*, 2017). Cette différence pourrait être fortement liée aux propriétés physico-chimiques des acides aminés utilisés (HBAs) qui interagissent plus ou moins favorablement avec le glycérol pendant le processus de préparation et avec les polyphénols contenus dans les feuilles d'olivier lors de l'extraction. Ces forces intermoléculaires impliquent les liaisons hydrogènes et même les interactions de van der Waals (Francisco *et al.*, 2013).

3.4. Comparaison de l'activité anti-oxydante des sous-produits oléicoles

Une comparaison de l'activité anti-oxydante entre différents sous-produits oléicoles (feuilles d'olivier, margines et grignons) est réalisée sous les conditions optimales ($R_{L/S} = 150$ mL g⁻¹, $C_{DES} = 90\%$, $T = 80$ °C) préalablement obtenues avec les DESs étudiés en utilisant les feuilles d'olivier comme source de polyphénols.

Il apparait, au vu des résultats consignés sur le [tableau XXI](#), que le mélange GL–Lys est le solvant qui extrait le plus de polyphénols à partir des trois produits oléicoles. Nous relevons aussi que les margines présentent le taux de polyphénols le plus élevé par rapport aux feuilles et aux grignons d'olive tel qu'il a été observé par [Tercan et Seker, 2010](#). Dans cette étude, il a été noté que l'interaction entre le solvant et la source des polyphénols est plus importante lorsque celle-ci est moins compacte. Cette information explique la raison pour laquelle nous observons un meilleur rendement d'extraction avec les margines par rapport aux grignons et feuilles d'olivier qui seraient plus solides. De plus, nous observons un même ordre d'activité anti-oxydante des polyphénols extraits avec les solvants conventionnels. Parmi ces derniers, l'éthanol s'avère le plus efficace dans l'extraction des polyphénols, suivi du méthanol ensuite de l'eau. Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par d'autres études ([Lafka *et al.*, 2013](#) ; [Kim et Lee, 2017](#)).

Tableau XXI : Comparaison de l'activité anti-oxydante (mg équivalent d'acide gallique) obtenue avec différents sous-produits oléicoles. L'extraction des polyphénols est réalisée sous les conditions optimales obtenues avec les DESs en utilisant les feuilles d'olivier.

	Feuilles d'olivier	Margines	Grignons
Glycérol-Lysine	188.39 ±0.372	199.97 ±0.003	132.57 ±0.003
Glycérol-Proline	95.970 ±2.637	160.22 ±0.003	44.360 ±0.001
Glycérol-Arginine	100.01 ±1.976	129.41 ±0.002	71.480 ±0.001
Eau	52.970 ±0.001	81.160 ±3.072	12.900 ±1.675
Ethanol 70%	65.950 ±0.002	85.310 ±3.537	20.867 ±2.699
Méthanol 70%	62.270 ±0.001	87.940 ±2.047	19.870 ±2.234

Les valeurs présentées sont les moyennes calculées ±l'écart type.

3.5. Quantification des polyphénols par LC-MS/MS

Les composés polyphénoliques des extraits obtenus avec les DESs et l'éthanol 70% ont été quantifiés par la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS). Les résultats (Tableau XXII) montrent une teneur générale en polyphénols supérieure dans le cas des DESs par rapport à celle de la solution étalonique. Ce résultat est en accord avec la détermination des polyphénols réalisée avec la méthode au Folin Ciocalteu décrite plus haut.

L'analyse individuelle de chaque composé montre des différences importantes de la teneur en tyrosol par rapport aux valeurs rapportées par la littérature, qui varient entre 90 à 660 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Özcan *et al.*, 2016). De plus, la concentration du tyrosol dans cette étude est supérieure à celle de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropéine. Ce résultat ne se situe pas dans la même tendance que celle mentionnée par certains auteurs qui ont rapporté des valeurs les plus faibles pour le tyrosol (Benavente-García *et al.*, 2000). Ceci pourrait être expliqué par la plus grande stabilité du tyrosol, comparée aux autres composés phénoliques ou, probablement, par la sélectivité des solvants utilisés pour l'extraction du tyrosol (Karković Marković *et al.*, 2019). Les polyphénols pouvaient interagir avec les DESs à travers des liaisons hydrogènes et, par conséquent, augmenter leur stabilité et solubilité dans ces solvants où la composition (HBD/HBA) joue un rôle critique dans l'efficacité de l'extraction (Dai *et al.*, 2014).

Notons qu'une forte corrélation linéaire est obtenue entre la teneur en tyrosol et celle des polyphénols totaux (TPC) avec tous les extraits DESs réalisés (Figure 40).

Tableau XXII : Quantification des composés phénoliques dans les extraits secs des feuilles d'olivier ($\mu\text{g g}^{-1}$) par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS).

Solvant	Concentrations des composés phénoliques ($\mu\text{g g}^{-1}$)				
	Tyrosol	Hydroxytyrosol	Oleuropéine	Lutéoline-7-O-Glucoside	Rutine
70% EtOH	19398.64± 362.12	205.78± 9.11	7381.03±52.14	1418.64±28.74	714.63±18.25
GL-Lys	53420.23 ± 1135.12	1687.95± 2.4	n.d	1377.14±17.25	286.69±0.69
GL-Pro	27358.48± 175.71	231.95±9.8	7908.10±59.45	997.84±80.51	463.06±4.92
GL-Arg	28312.65± 445.30	2686.44±7.9	n.d	1564.97±63.98	268.593±3.82

Les valeurs présentées sont les moyennes de six déterminations, suivies de l'écart type. n.d : non détecté.

En terme de variabilité de la teneur en polyphénols des feuilles d'olivier, plusieurs facteurs ont été recensés comme étant impliqués dans ces variations. Nous pouvons citer la procédure d'extraction, le stress hydrique, la salinité, la fertilisation, la zone géographique, la période d'échantillonnage, l'exposition à la lumière, l'âge des feuilles, le stress au froid, la variété de l'olivier, les taux de bactéries et champignons présents, etc. (Quirantes-Piné *et al.*, 2013 ; Talhaoui *et al.*, 2015).

Quant à l'hydroxytyrosol, sa teneur dans cette présente étude est inférieure à la majorité des valeurs rapportées par les autres auteurs (Vinha *et al.*, 2005 ; Ahmad-Qasem *et al.*, 2013 ; Cittan *et al.*, 2018). En revanche, elle est supérieure aux taux obtenus par Brahmi *et al.* (2013). De même pour l'oleuropéine, qui est absente des extraits de GL-Lys et GL-Arg, donne des teneurs assez proches de celles publiées dans le cas des extraits de GL-Pro et de la solution étalonique (Ortega-García *et al.*, 2010). Alors que sa teneur est supérieure à celle obtenue dans les investigations de Lee *et al.* (2009) et Afaneh *et al.* (2015).

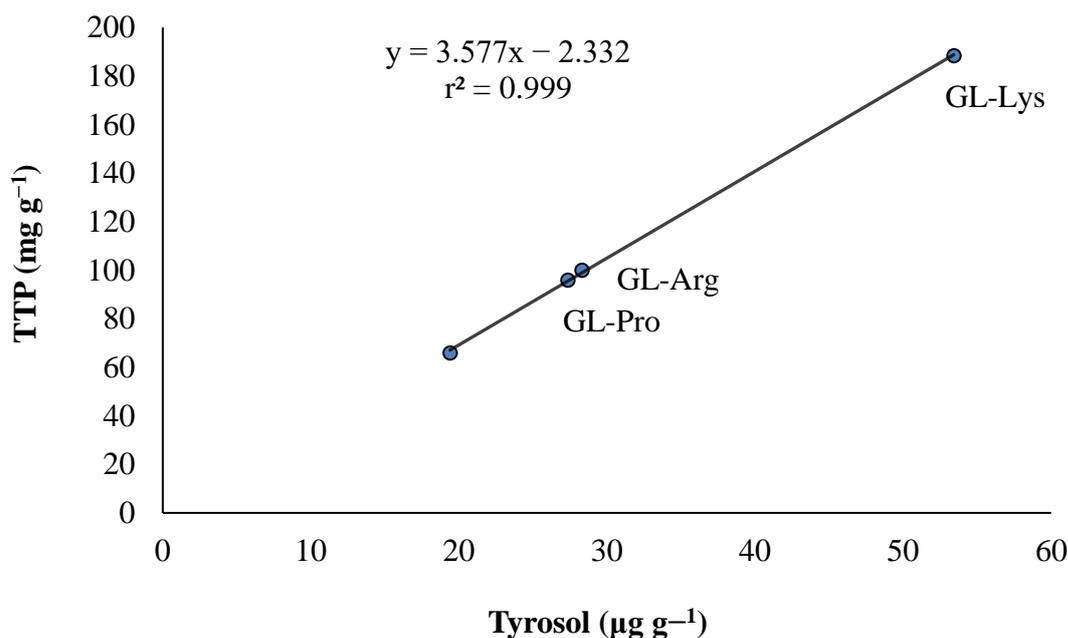


Figure 40 : Relation entre teneur totale en polyphénols (TTP) et concentration en tyrosol.

Il est à noter que les résultats de cette présente étude montrent une augmentation simultanée de la concentration de l'hydroxytyrosol et celle de l'oleuropéine. Cette observation est attribuée à la dégradation de l'oleuropéine en hydrotyrosol en raison des réactions chimiques et enzymatiques survenant lors du processus de traitement des feuilles d'olivier (Yuan *et al.*, 2015). En ce qui concerne les valeurs de la concentration de la lutéoline-7-O-glucoside et la rutine, elles se situent dans l'intervalle des limites supérieures et inférieures des valeurs rapportées dans la littérature (Liakopoulos *et al.*, 2005 ; Japón-Luján *et al.*, 2006 ; Goulas *et al.*, 2009 ; Talhaoui *et al.*, 2016).

3.6. Conclusion

Afin de contribuer à l'usage de procédés peu polluants dans la valorisation des sous-produits oléicoles, nous avons mené des investigations en synthétisant et testant trois nouveaux solvants eutectiques profonds à base de glycérol et d'acides aminés : glycérol-lysine, glycérol-proline et glycérol-arginine. Avec ces solvants et, à travers le plan d'expérience utilisé (Box-Behnken), nous avons pu déterminer les conditions optimales d'extraction des polyphénols. Et

l'effet des paramètres d'extraction sélectionnés ($R_{L/S}$, C_{DES} , T) sur le rendement d'extraction des polyphénols.

Nous avons observé un effet significatif pour tous les paramètres étudiés sur le rendement en polyphénols. En outre, les résultats de l'évaluation de l'activité anti-oxydante des différents extraits de polyphénols obtenus sous les conditions optimales révèlent que le mélange glycérol-lysine est le solvant le plus efficace pour l'extraction des polyphénols issus des feuilles d'olivier par comparaison aux autres DESs et aux solvants conventionnels. Ce résultat est encore une fois observé lors de l'utilisation de ces mêmes conditions dans l'extraction des polyphénols à partir des margines et des grignons d'olive. Par ailleurs, la quantification des composés phénoliques par LC-MS/MS nous a permis d'observer une teneur générale en polyphénols supérieure dans le cas des DESs par rapport à celle des solvants conventionnels.

Chapitre 2 : Les protéines sériques du lait : isolement, caractérisation et évaluation de l'activité anti-oxydante des protéines et leurs hydrolysats

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés aux protéines sériques du lait qui se retrouvent rejetés dans le lactosérum par suite du procédé de fabrication fromagère. Dans une perspective de contribuer à la valorisation de ces rejets industriels de première importance, nous avons exploré une approche mathématique d'optimisation du processus d'hydrolyse enzymatique de ces protéines issues du lait bovin. Cette approche vise à établir les conditions d'hydrolyse optimales avec les enzymes digestives (chymotrypsine, trypsine et pepsine), opérant séparément ou en combinaison, afin de maximiser l'activité anti-oxydante des hydrolysats obtenus. Nous nous sommes intéressés également dans ce chapitre à la sensibilité de ces protéines issues de plusieurs espèces (bovin, caprin, ovin et camelin) vis-à-vis de ces enzymes protéolytiques.

3.2. Isolement des protéines sériques des laits des différentes espèces

3.2.1. Mesure du pH

Les valeurs moyennes du pH des différentes espèces de lait sont présentées dans le [tableau XXIII](#). Nous remarquons que les pH des différents échantillons dans cette étude se situent dans les intervalles établis par la littérature. Il est rapporté que le pH du lait bovin, caprin, ovin, et camelin est compris dans les intervalles [6.6, 6.8], [6.3, 6.7], [6.6, 6.8], [6.31, 6.64], respectivement ([Assenat, 1991](#) ; [Guo, 2003](#) ; [Tsioulpas *et al.*, 2007](#) ; [Ismaili *et al.*, 2016](#)). D'après la littérature les variations du pH du lait au sein de la même espèce dépendent de la composition de celui-ci (caséines, phosphate, vitamine C, acide gras, etc.), son état de fraîcheur (qualité microbiologique) et des facteurs zootechniques (alimentation, stade de lactation, conditions de la traite et période de la traite) ([Tsioulpas *et al.*, 2007](#) ; [Rahli *et al.*, 2013](#) ; [Ismaili *et al.*, 2016](#)).

Tableau XXIII : pH du lait des différentes espèces.

	Lait bovin	Lait caprin	Lait ovin	Lait camelin
pH	6.79±0.01	6.68±0.01	6.72±0.02	6.50±0.01
Provenance	Tizi Ouzou	Tizi Ouzou	Djelfa	Oued Souf

3.2.2. Dosage des fractions protéiques

Les résultats de quantification des différentes fractions du lait bovin, caprin, ovin et camelin sont présentés dans le [tableau XXIV](#).

Tableau XXIV : Teneurs moyennes du lait des différentes espèces.

	Lait bovin	Lait caprin	Lait ovin	Lait camelin
Protéines totales (g L⁻¹)	30.50±0.04	41.90±0.03	49.67±0.05	32.23±0.01
Protéines sériques (g L⁻¹)	5.100±0.01	5.320±0.01	4.160±0.02	5,710±0.01
Caséines (g L⁻¹)	25.40±0.07	36.58±0.01	45.51±0.01	26.52±0.01

Les valeurs obtenues indiquent que le lait ovin est le plus riche en protéines totales (49.67 g L⁻¹) par rapport aux autres laits. En revanche, la valeur la plus basse a été obtenue avec le lait de vache (30.50 g L⁻¹). Ce résultat est en accord avec les données de la littérature qui rapporte des teneurs élevées en protéines totales chez l'ovine ainsi qu'une tendance similaire chez le bovin (Cozma *et al.*, 2011). Le taux limite en protéines de l'échantillon de lait de vache collecté trouve son explication dans l'alimentation relativement carencée, pauvre en herbe verte, qui est selon plusieurs auteurs, un facteur important dans la richesse en protéine du lait, en plus de la race (Jenkins *et al.*, 2006 ; Alothman *et al.*, 2019).

Les résultats indiquent que la fraction de caséine est majoritaire dans les différents laits où celui de brebis est le plus concentré en caséines (45.51 g L⁻¹). Notons aussi que dans l'ensemble, la teneur en protéines sériques des autres laits est assez similaire et se situe autour de ~5 g L⁻¹.

3.2.3. Isolement des protéines sériques et analyse électrophorétique

La précipitation des protéines du lait au point isoélectrique est un moyen d'isolement de ces dernières qui est pratiqué couramment aux seins des laboratoires, mais en procédant à des réajustements selon l'espèce laitière considérée. Les caséines sont précipitées à pH 4.6 dans le cas du lait bovin et ovin. Par contre les pH 4.2 et 4.3 sont utilisés pour la précipitation des caséines des laits caprin et camelin respectivement (Mati *et al.*, 1991 ; Farrell *et al.*, 2004 ; Si Ahmed Zennia *et al.*, 2015 ; Zobiri-Illoul *et al.*, 2020).

Sur la base du pH utilisé, le lactosérum peut être classé en lactosérum acide quand son pH est (<5.1), et en lactosérum doux quand le pH est (>5.6) (Durham et Hourigan, 2007 ; Chavan *et al.*, 2015). Ainsi, procédant par acidification, nous obtenons un lactosérum acide avec des caractéristiques relativement comparables à celles du lactosérum doux (Tableau XXV).

Tableau XXV : Composition du lactosérum doux et acide (Durham, 2000)

Composition	Lactosérum doux	Lactosérum acide	
		HCL	Acide lactique
Matière sèche (%)	6.6	5.1	6.0
pH	6.1	4.7	4.0
Lactose(%)	4.8	3.7	3.9
Protéines (%)	0.9	0.73	0.72
Cendre (%)	0.59	0.60	0.72
Acide lactique (%)	0.13	0	0.60
Matière grasse (%)	0.06	0.05	0.003
Calcium (ppm)	430	1200	1140
Phosphore (ppm)	440	680	900
Potassium (ppm)	1460	1200	1530
Sodium (ppm)	430	270	400
Chlorure (ppm)	970	2600	910

Afin de vérifier la pureté de nos échantillons et leur non contamination, notamment par des résidus de caséines, une analyse électrophorétique est réalisée. Cette analyse, conduite en

conditions natives et en conditions dénaturantes en présence de détergent anionique (PAGE-native et PAGE-SDS) nous permet d'avoir, par comparaison avec les profils décrits dans la littérature dans les mêmes conditions, une pré-identification des entités protéiques présentes. Il va sans dire que l'identification précise passe par l'isolement des protéines individuelles (ou le transfert des bandes sur des membranes) suivi d'un séquençage de l'extrémité N-terminale.

3.2.3.1. Comportement électrophorétique en conditions non dissociantes

Le profil électrophorétique sur gel de polyacrylamide des protéines sériques en conditions non dissociantes (PAGE-native) est présenté sur la [figure 41](#). Globalement, l'allure des entités protéiques est assez comparable entre les espèces dans le nombre et l'intensité des bandes de migration, même s'il y a quelques différences, notamment par rapport à la référence bovine dans certains cas (lait camelin et caprin) et pour certaines protéines (α -La, β -Lg et PP3).

Nous pouvons distinguer 5 bandes de migration, correspondant aux protéines sériques majeures du lait bovin, caprin et ovin, dans l'ordre suivant en partant du dépôt : immunoglobulines, composant-3 des protéose-peptones, l'albumine sérique, l' α -Lactalbumine, puis la β -Lactoglobuline. Par contre, nous observons une bande supplémentaire pour le lactosérum camelin, qui correspondrait selon la littérature à la lactoferrine ([Wangoh et al., 1998](#) ; [Singh et al., 2017](#)) et deux bandes de même intensités correspondant aux variants de l' α -Lactalbumine, qui est la protéine majeure de ce lait ([Conti et al, 1985](#)).

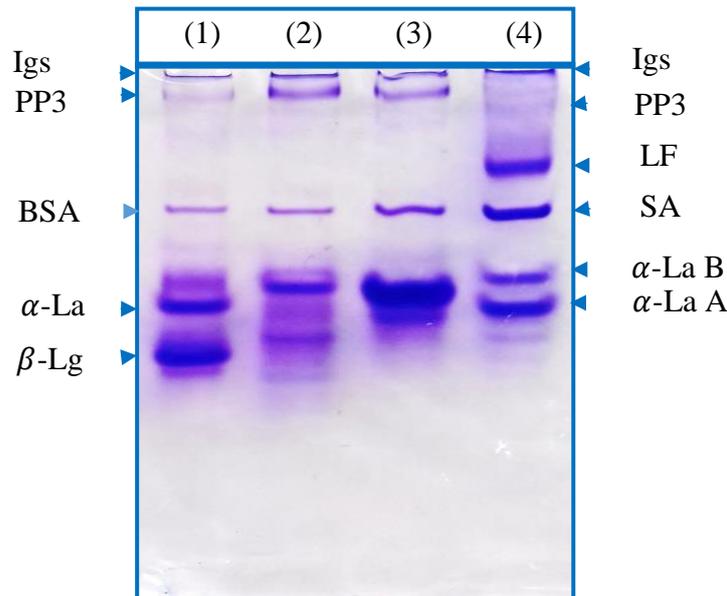


Figure 41 : Profils électrophorétiques sur gel de polyacrylamide en conditions non dissociantes (PAGE-native) des protéines solubles du lactosérum bovin (1), caprin (2), ovin (3) et camelin (4).

Igs : immunoglobulines ; PP3 : composante -3 des protéoses peptones ; LF : lactoferrine ; SA, sérum albumine ; α -La : α -Lactalbumine ; β -Lg : β -Lactoglobuline.

3.2.3.2. Comportement électrophorétique dans les conditions dissociantes

Dans les conditions dissociantes et dénaturantes en présence de dodécyl sulfate de sodium (PAGE-SDS), les profils électrophorétiques obtenus présentent une certaine similitude au niveau du nombre de bandes et des niveaux de migration pour les protéines sériques du lait bovin, caprin et ovin (Figure 42). Le profil des protéines sériques du lait camelin se singularise par l'absence de β -Lg et la présence d'une bande inhabituelle bien focalisée proche de l' α -La de ce même profil. De plus, les bandes correspondantes à la lactoferrine, à l'albumine sérique et aux IgG sont plus intenses et bien focalisées.

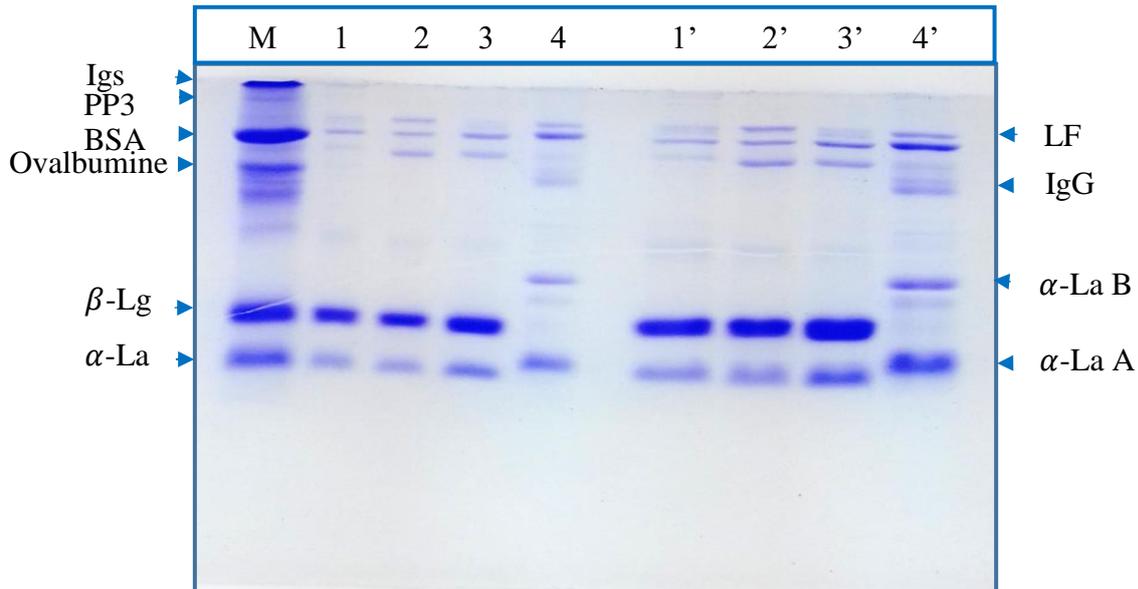


Figure 42 : Profils électrophorétiques sur gel de polyacrylamide en PAGE-SDS (15%, C=2.7%) des protéines solubles du lactosérum bovin (1), caprin (2), ovin (3) et camelin (4). (1, 2, 3, 4 : dépôt 5 μ L, 1', 2', 3', 4' : dépôt 10 μ L). Igs : immunoglobulines ; IgG : immunoglobulines G ; PP3 : composante 3 des protéose-peptones ; LF : lactoferrine ; SA : sérum albumine ; α -La : α -Lactalbumine ; β -Lg : β -Lactoglobuline.

Globalement, nous observons une migration électrophorétique de 7 bandes ayant un aspect net et bien focalisé. Les deux premières peu apparentes correspondraient aux Igs et PP3 car, comme rapporté par [Mati et al. \(1991\)](#), la migration de ces deux entités est faible en raison de leur structure non globulaire et leur caractère glycosylé et hydrophobe. Ensuite, selon l'ordre décroissant de leurs poids moléculaires, nous distinguons la lactoferrine, l'albumine sérique, les IgG, la β -Lg et enfin l' α -La dans le cas des lactosérums bovin, caprin et ovin.

Pour le lait camelin, différents auteurs signalent l'existence de protéines spécifiques à ce lait d'où l'apparition de petites bandes supplémentaires sur le profil ([Conti et al., 1985](#) ; [Farah, 1986](#) ; [Beg et al, 1987](#) ; [Ochirkhuyag, 1998](#) ; [Merin et al, 2000](#) ; [Ismail, 2017](#)). D'une façon générale, l'ordre de migration obtenu est en accord avec plusieurs études déjà publiées ([Farrell et al., 2004](#) ; [Veith et Reynolds, 2004](#) ; [El Hatmi et al., 2015](#)).

3.3. Processus d'optimisation de l'hydrolyse enzymatique

Un plan factoriel complet (FFD) à trois niveaux et un plan Box-Behnken ont été appliqués afin d'étudier l'effet combiné des variables indépendantes (temps de sonication, ratio *E:S*, et ratio *E1:E2*) sur l'activité anti-oxydante des hydrolysats du lactosérum bovin et de trouver les valeurs optimales de ces variables. Les plans FFD et BBD consistent à réaliser respectivement douze et quinze expérimentations avec les différentes combinaisons de variables. Les [tableaux XXVI et XXVII](#) présentent les plans expérimentaux et les valeurs mesurées et prédites de chaque plan d'expérience.

Tableau XXVI : Plan factoriel complet codé et non-codé avec les données mesurées et prédites.

Expérimentation	Variables indépendantes		Valeur CUPRAC ($\mu\text{M Cys L}^{-1}$)					
	Temps de sonication (X_1 , min)	<i>E:S</i> (X_2 , % v/v)	Pepsine		Chymotrypsine		Trypsine	
			Mesurées	Prédites	Mesurées	Prédites	Mesurées	Prédites
1	25(0)	3.5(0)	542.00	533.17	739.00	734.19	601.00	601.19
2	10(-1)	2(-1)	455.00	459.21	607.00	599.35	614.00	624.09
3	25(0)	3.5(0)	533.00	533.17	730.00	734.18	597.50	601.19
4	25(0)	3.5(0)	528.50	533.17	715.00	734.18	618.00	601.19
5	40(+1)	5(+1)	522.50	516.71	599.00	610.02	595.00	578.53
6	25(0)	2(-1)	517.50	503.07	649.00	656.54	529.00	526.43
7	10(-1)	5(+1)	575.00	563.21	701.00	704.77	433.00	434.15
8	10(-1)	3.5(0)	518.50	526.07	744.00	747.37	663.70	652.43
9	25(0)	3.5(0)	532.30	533.17	746.00	734.18	601.00	601.19
10	25(0)	5(+1)	516.00	533.57	636.00	621.21	414.00	429.32
11	40(+1)	2(-1)	549.50	559.71	787.00	786.11	590.30	582.81
12	40(+1)	3.5(0)	557.50	533.07	804.00	793.37	680.00	703.99

Tableau XXVII : Plan Box-Behnken codé et non-codé avec les données mesurées et prédites.

Expérimentation	Variables indépendantes			Valeur CUPRAC ($\mu\text{M Cys L}^{-1}$)					
	Temps de sonication (X_1 , min)	$E:S$ (X_2 , % v/v)	$E1:E2$ (X_3 , %)	Pepsine-Chymotrypsine		Pepsine-Trypsine		Chymotrypsine-Trypsine	
				Mesurées	Prédites	Mesurées	Prédites	Mesurées	Prédites
1	25(0)	2(-1)	30(-1)	363.67	367.17	491.00	500.79	503.00	495.30
2	25(0)	3.5(0)	50(0)	540.33	550.78	502.00	583.44	630.33	635.67
3	25(0)	2(-1)	70(+1)	598.67	587.17	512.00	512.75	499.00	503.89
4	25(0)	3.5(0)	50(0)	543.00	550.78	464.33	483.44	635.67	635.67
5	10(-1)	3.5(0)	70(+1)	614.00	626.84	438.00	439.35	562.33	559.56
6	10(-1)	5(+1)	50(0)	655.00	645.67	390.67	399.11	792.00	787.00
7	10(-1)	3.5(0)	30(-1)	577.67	575.51	472.33	464.64	558.67	568.56
8	25(0)	5(+1)	70(+1)	640.67	457.17	403.50	393.71	566.00	573.77
9	40(+1)	3.5(0)	70(+1)	536.00	538.19	433.33	441.02	529.00	519.10
10	40(+1)	5(+1)	50(0)	548.67	550.01	456.00	458.10	581.00	583.12
11	10(-1)	2(-1)	50(0)	532.00	530.69	445.33	443.30	561.50	559.37
12	25(0)	3.5(0)	50(0)	569.00	550.78	484.00	438.44	641.00	635.67
13	25(0)	5(+1)	30(-1)	632.33	643.83	552.00	551.25	582.00	577.67
14	40(+1)	2(-1)	50(0)	509.00	518.34	491.00	482.56	654.00	650.00
15	40(+1)	3.5(0)	30(-1)	569.00	556.17	562.67	561.31	502.00	504.77

3.3.1. Validation des modèles mathématiques

La validation des modèles développés a tenu compte d'un certain nombre de paramètres statistiques (normalité, coefficient de détermination (r^2), valeur p (p-value), coefficient de variation, etc.).

L'analyse des données obtenues par le test de Shapiro–Wilk montre que ces dernières suivent en général une loi normale et ne comportent aucune observation aberrante. Les données obtenues avec la trypsine et la combinaison chymotrypsine-trypsine sont normalisées en utilisant la transformation Box-Cox avec $\lambda = +1.55$, et $\lambda = 1.2$, respectivement.

Le [tableau XXVIII](#) récapitule les équations finales en terme de variables significatives codées et leurs interactions. Il est clair que les modèles pepsine, chymotrypsine, trypsine, pepsine-chymotrypsine, pepsine-trypsine et chymotrypsine-trypsine sont hautement significatifs vu que la valeur du $r^2 \geq 0.90$ et que ces modèles expliquent la variation de l'activité anti-oxydante à un niveau $\geq 90\%$.

Tableau XXVIII : Equations polynomiales et paramètres statistiques calculés après implémentation des plans d'expérience.

Enzymes	Equations polynomiales du premier et deuxième ordre	r^2	p
Pepsine	$Y_{\text{CUPRAC}} = 475.09 + 0.9 X_1 + 10.17 X_2 - 1.63 X_1 \times X_2$	0.90	0.0066
Chymotrypsine	$Y_{\text{CUPRAC}} = 737.08 + 1.53 X_1 - 11.78 X_2 - 3.13 X_1 \times X_2 + 0.16 X_1^2 - 42.36 X_2^2$	0.98	<0.0001
Trypsine	$Y_{\text{CUPRAC}} = 671.52 + 1.72 X_1 - 32.37 X_2 + 2.06 X_1 \times X_2 + 0.34 X_1^2 - 54.81 X_2^2$	0.98	<0.0001
Pepsine-Chymotrypsine	$Y_{\text{CUPRAC}} = 550.78 - 27 X_1 + 36.67 X_2 - 20.3 X_1 \times X_2 - 101.67 X_2 \times X_3 + 35.36 X_1^2 - 24.97 X_2^2$	0.98	0.0008
Pepsine-Trypsine	$Y_{\text{CUPRAC}} = 483.44 + 24.58 X_1 - 17.14 X_2 - 36.40 X_3 - 23.75 X_1 \times X_3 - 42.37 X_2 \times X_3 - 25.37 X_1^2$	0.96	0.0041
Chymotrypsine-Trypsine	$Y_{\text{CUPRAC}} = 635.67 - 26.06 X_1 + 37.93 X_2 - 75.87 X_1 \times X_2 - 103.64 X_3^2$	0.99	<0.0001

Les résultats du test d'ajustement réalisés pour les six modèles montrent un $r^2 \geq 0.98$ et une p-value ≥ 0.05 . Notons que ces résultats appuient la robustesse de tous ces modèles.

De plus, la détermination du coefficient de variation (CV) et le coefficient de corrélation entre les valeurs mesurées et les valeurs prédites montre une faible valeur du CV (< 10%), ce qui indique que l'écart entre les valeurs mesurées et les valeurs prédites est faible. Par conséquent, les résultats de la vérification de ces paramètres présentent une forte indication que les modèles développés sont d'une fiabilité et précision adéquates.

D'autre part, les valeurs expérimentales obtenues sous les conditions optimales ont été comparées aux valeurs prédites dans le [tableau XXIX](#). Les résultats montrent que l'ensemble des valeurs mesurées se situe dans l'intervalle des valeurs prédites. Sur la base de tous les paramètres statistiques, nous pouvons conclure que les modèles mathématiques utilisés dans le cadre de cette étude sont des modèles de prédiction valides et convenables pour l'optimisation des conditions de l'hydrolyse enzymatique.

Tableau XXIX : Conditions optimales prédites et comparaison des valeurs CUPRAC observées et prédites. L'hydrolyse est réalisée sous les conditions optimales obtenues avec chaque modèle enzymatique.

Enzymes	Valeurs de l'intervalle prédit ($\mu\text{M Cys L}^{-1}$)	Valeurs observées* ($\mu\text{M Cys L}^{-1}$)	Conditions optimales		
			Temps de sonication (min)	E:S (% v/v)	E1:E2 (% v/v)
Pepsine	[535.266, 591.164]	575.00±0.01	10	5	-
Chymotrypsine	[789.727, 837.685]	815.33±0.02	40	2.81	-
Trypsine	[675.1307, 32.861]	680.00±0.01	40	3.5	-
Pepsine-Chymotrypsine	[660.589, 758.800]	668.00±0.04	10	5	30
Pepsine-Trypsine	[532.559, 625.705]	533.00±0.01	40	5	30
Chymotrypsine-Trypsine	[764.959, 809.312]	771.67±0.02	10	5	49.30

* moyenne±écart type de trois déterminations.

3.3.2. Effet des facteurs étudiés sur l'hydrolyse enzymatique

Les résultats indiquent que les variables temps de sonication, ratio *E:S*, ratio *E1:E2* (X_1 , X_2 , X_3) ont un effet significatif ($p < 0.05$) sur le processus de l'hydrolyse enzymatique à travers les modèles, à l'exception de la variable X_3 qui ne montre pas d'influence significative dans le cas des modèles pepsine-chymotrypsine et chymotrypsine-trypsine. De plus, nous observons un effet croisé significatif avec quelques variables telles que $X_1 \times X_2$ dans les modèles pepsine, chymotrypsine, trypsine, pepsine-chymotrypsine, chymotrypsine-trypsine, $X_2 \times X_3$ avec les modèles pepsine-chymotrypsine, pepsine-trypsine et $X_1 \times X_3$ avec la pepsine-trypsine.

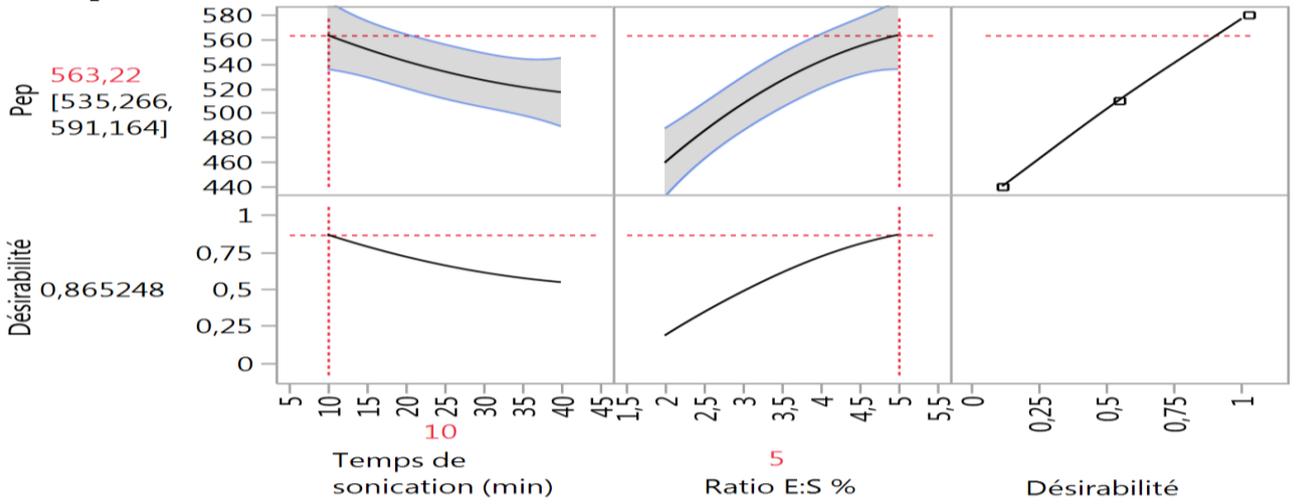
Par ailleurs, la valeur CUPRAC désirée est atteinte sous différentes conditions optimales propres à chaque modèle enzymatique. Ces conditions peuvent être visualisées sur l'évolution des profils de prédiction qui examinent les relations dynamiques simultanées entre toutes les données et les résultats (Figure 43). L'évolution de ces profils de prédiction présentent une tendance générale courbée à travers tous les modèles, ce qui illustre une réponse non-linéaire des effets obtenus.

3.3.2.1. Temps de sonication

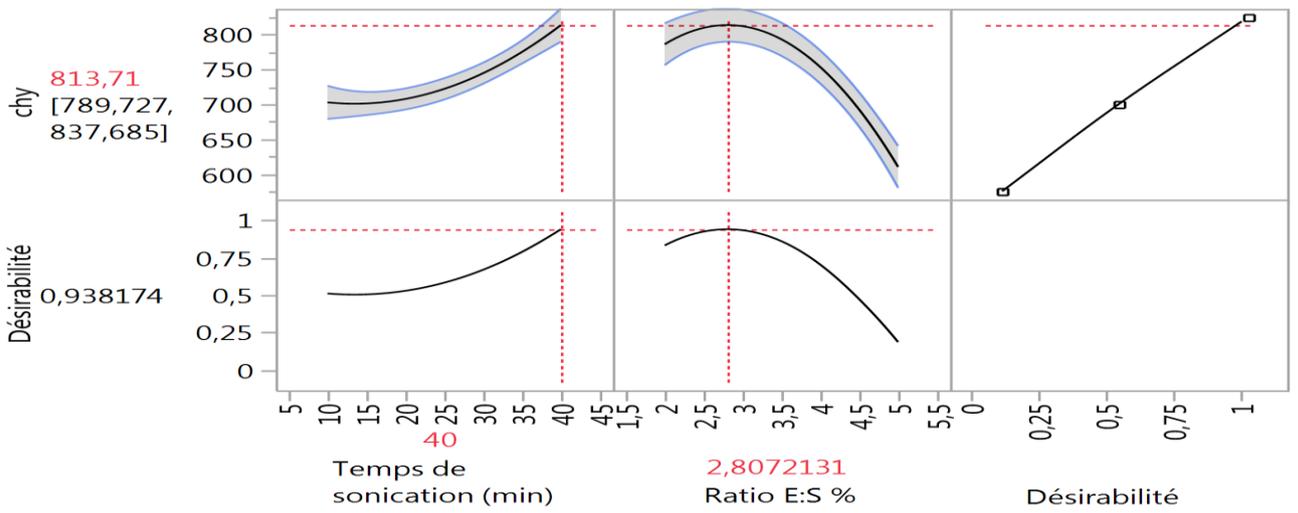
Les résultats ont révélé un effet significatif pour le temps de sonication (X_1) sur l'activité anti-oxydante à travers les six modèles. Ceci est en accord avec les données de la littérature qui mettent l'accent sur l'importance du prétraitement aux ultrasons sur l'hydrolyse des protéines (Abadía-García *et al.*, 2016). En effet, l'impact des ultrasons est principalement causé par un réarrangement dans la structure protéique qui a pour effet d'engendrer une meilleure accessibilité de l'enzyme aux sites d'hydrolyse préalablement enfuies à l'intérieur du cœur hydrophobe de la protéine (Adjonu *et al.*, 2013 ; Ozuna *et al.*, 2015).

Nous relevons à travers les résultats un temps de sonication optimal à 10 min avec les modèles pepsine, pepsine-chymotrypsine et chymotrypsine-trypsine. Par contre, les modèles chymotrypsine, trypsine, et pepsine-trypsine montrent un temps optimal à 40 min.

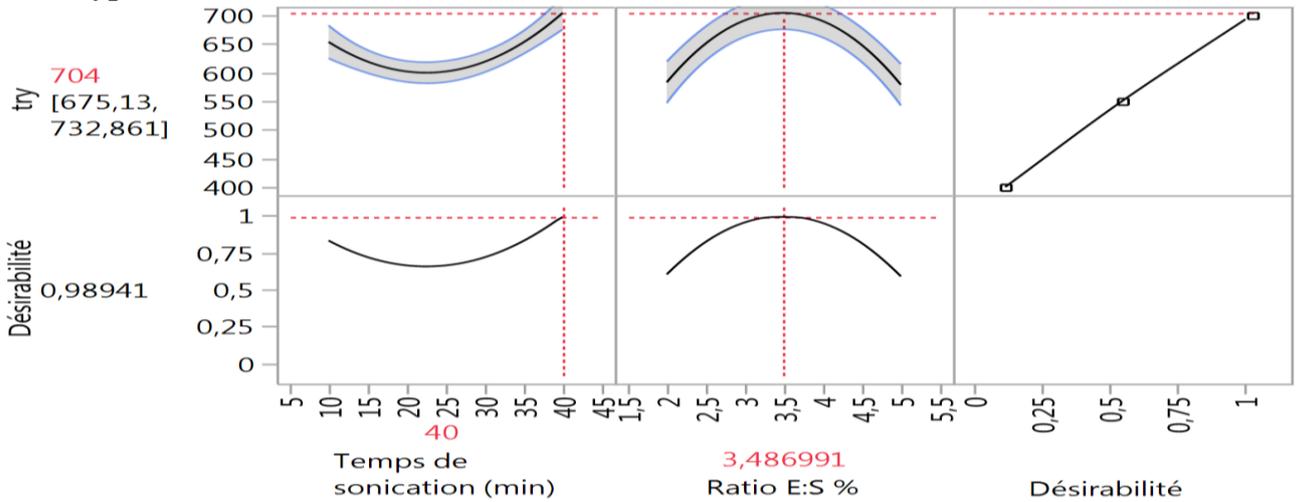
A. Pepsine



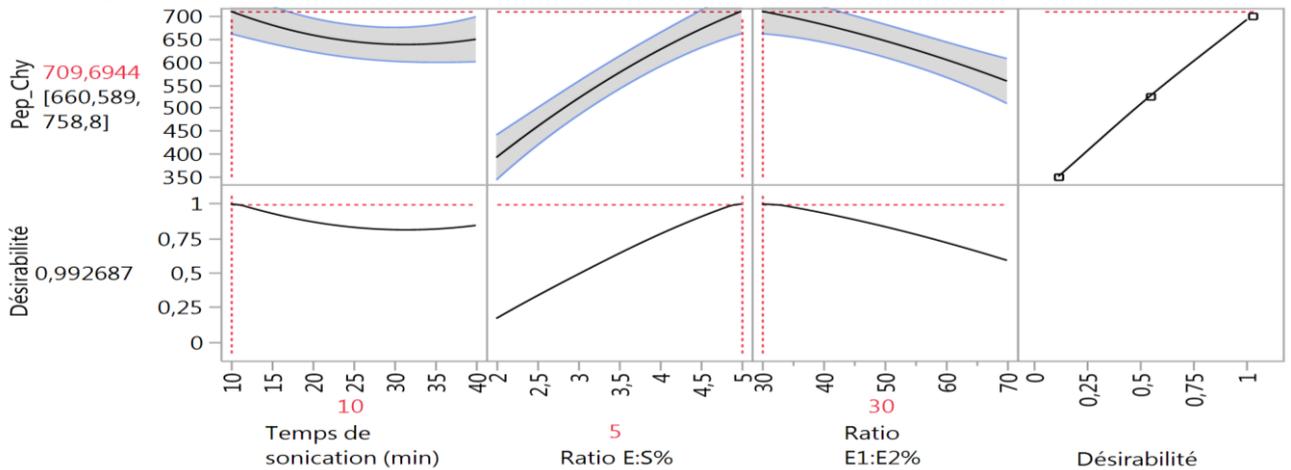
B. Chymotrypsine



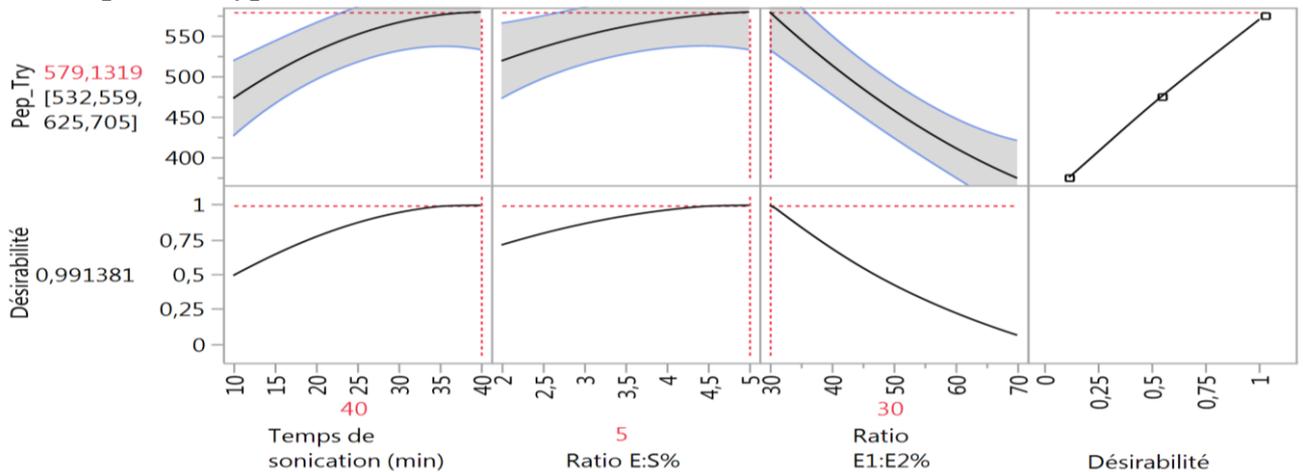
C. Trypsine



D. Pepsine–Chymotrypsine



E. Pepsine–Trypsine



F. Chymotrypsine–Trypsine

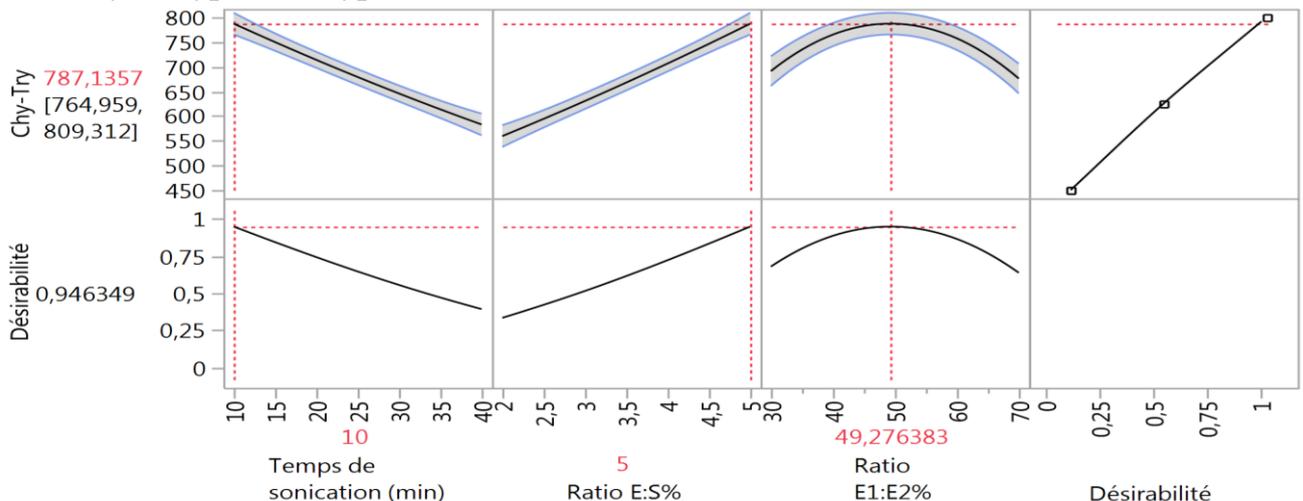


Figure 43 : Evolution des profils prédictifs présentant la désirabilité générale des enzymes : pepsine (A), chymotrypsine (B) trypsine (C), pepsine-chymotrypsine (D), pepsine-trypsine (E), chymotrypsine-trypsine (F), avec les valeurs optimales des variables : temps de sonication $E:S$, et $E1:E2$.

Les résultats indiquent aussi un effet favorable de la sonication avec tous les modèles sauf avec la pepsine-chymotrypsine et chymotrypsine-trypsine où un effet significatif défavorable est observé.

L'effet négatif survenant à 10 min de sonication suggère que cette durée est insuffisante pour l'exposition des sites de clivage. Ceci est surtout valable pour la trypsine et chymotrypsine qui sont des enzymes à serine, actives à pH basiques où le rapprochement enzyme-substrat se fait dans une poche hydrophobe, qui doit être rendue accessible pour favoriser l'attaque nucléophile par la serine. Par ailleurs, les résultats indiquent un effet enzyme dépendant à l'égard de la sonication, car un effet positif est observé avec la pepsine à la même durée de sonication. Cette enzyme, qui agit à pH acide à gauche des acides aminés aromatiques, a probablement besoin d'une durée de sonication limitée pour l'augmentation de l'affinité Enzyme-substrat.

D'autre part, les résultats montrent que la valeur CUPRAC la plus élevée (815.33 μM équivalent de Cys L^{-1}) est obtenue à 40 min de sonication avec la chymotrypsine. Il apparaît que la prolongation du temps de sonication et l'augmentation progressive de la température (39°C) dans le bain de sonication ont amélioré l'activité anti-oxydante dans cette étude. Ce résultat est en accord avec les observations de [Gammoh et al. \(2020\)](#), [Ma et al. \(2018\)](#), et [Chandrapala et al. \(2011\)](#) qui rapportent que le contenu en thiols totaux n'est pas affecté par le temps de sonication car la localisation intramoléculaire des groupements thiols empêche leur dégradation par les ultrasons.

Cependant, d'autres études ont observé une diminution de l'activité anti-oxydante suite à la prolongation du temps de sonication qui pourrait conduire à l'agrégation des protéines et la dégradation des sites catalytiques. Ces divergences pourraient être attribuées aux différents paramètres du traitement ultrasonique utilisés (intensité, amplitude, fréquence) et à la complexité de l'échantillon et sa pureté ([Wali et al., 2017](#)).

3.3.2.2. Ratio enzyme/substrat

Les résultats indiquent que le facteur $E:S$ ratio (X_2) exerce une influence significative sur l'activité anti-oxydante des hydrolysats à travers tous les modèles (simples et combinés). Ce résultat est en accord avec la littérature qui souligne l'importance du ratio $E:S$ parmi les autres paramètres d'hydrolyse en relation avec le taux d'hydrolyse et la libération des hydrolysats ([Nongonierma et al., 2017](#)).

Dans cette étude, l'activité anti-oxydante la plus élevée est obtenue avec la chymotrypsine à un ratio de (2.81%). Ce qui coïncide avec le ratio $E:S$ le plus bas parmi les ratios des modèles étudiés. Il a été rapporté que l'utilisation des ratios $E:S$ faibles aboutie à l'activité anti-oxydante la plus élevée car le taux des di- et tri-peptides augmente et celui des grands peptides diminue ([Silva et al., 2010](#)). C'est également la raison pour laquelle l'activité anti-oxydante obtenue avec la trypsine est classée 3^{ème} avec un ratio $E:S$ de 3.5% par rapport à celle des autres modèles où l'activité anti-oxydante optimale est obtenue à un ratio $E:S$ 5%.

Par ailleurs, les résultats montrent des valeurs CUPRAC différentes à un même ratio $E:S$ (5%) dans le cas des modèles de la pepsine et des enzymes combinées (pepsine-chymotrypsine, pepsine-trypsine et chymotrypsine-trypsine). Les variations observées pourraient être dues aux conditions d'hydrolyse de l'enzyme et à sa spécificité, ainsi qu'à l'activité des enzymes dans chaque modèle (Morais *et al.*, 2013). De plus, le fait d'avoir un temps d'hydrolyse réduit pour la chymotrypsine et la trypsine dans les modèles combinés incluant la pepsine pourrait également contribuer aux variations obtenues.

Par conséquent, la valeur CUPRAC la plus élevée devrait correspondre au modèle où la spécificité de l'enzyme permet la libération des fractions qui contiennent des acides aminés connus pour leur effet antioxydant tels que la tyrosine, le tryptophane, l'histidine, la cystéine, la méthionine, etc. (Cichosz *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2020). De plus, il a été observé que l'hydrolyse extensive à des ratios $E:S$ élevés conduit à la libération d'acides aminés libres qui montrent une activité anti-oxydante inférieure par rapport à celle des petits peptides (Fasasi *et al.*, 2012).

3.3.2.3. Ratio des enzymes combinées

Les résultats obtenus concernant le facteur $E1:E2$ (X_3) indiquent un impact significatif mais négatif sur l'activité anti-oxydante dans le cas du modèle pepsine-trypsine. Cependant, l'influence du ratio $E1:E2$ sur l'activité anti-oxydante n'est pas statistiquement significative dans les cas des modèles pepsine-chymotrypsine et chymotrypsine-trypsine. Les résultats des optimums $E1:E2$ (%) obtenus sont respectivement 30:70, 30:70, et 49.3:50.7 pour la pepsine-trypsine, pepsine-chymotrypsine et chymotrypsine-trypsine.

Notons qu'en terme d'activité anti-oxydante, ces combinaisons telles qu'elles sont mentionnées sont classées 6^{ème}, 4^{ème}, et 2^{ème} parmi les six modèles étudiés. Il est important de souligner que dans le cas du complexe pepsine-trypsine, les valeurs CUPRAC de la pepsine et trypsine séparées sont classées 5^{ème} et 3^{ème}, respectivement. A partir de ce résultat, il est évident que le fait de combiner ces deux enzymes devient plus désavantageux pour la trypsine. Ceci pourrait être attribué soit à la réduction du temps d'exposition des protéines sériques à la trypsine, ou bien au contraire à une hydrolyse extensive qui a atteint un effet synergique avec la pepsine et la trypsine.

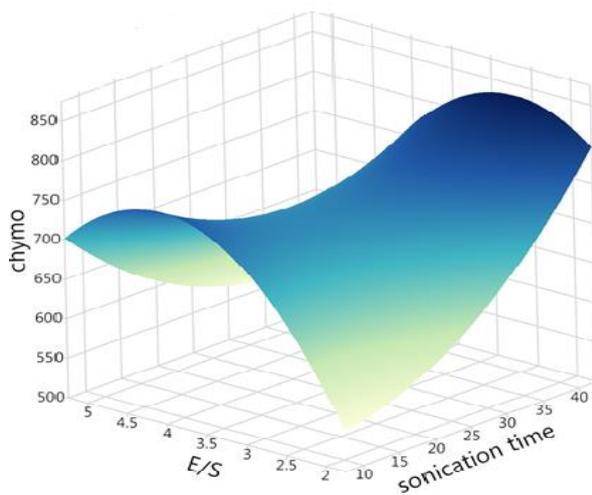
En principe, un effet synergique conduirait à un effet antioxydant supérieur à celui engendré avec les enzymes individuelles (Basavegowda et Baek, 2021). Cependant, si l'hydrolyse avec le complexe pepsine-trypsine a abouti à la libération d'acides aminés libres, l'activité anti-oxydante ne sera pas aussi élevée que celle des di- et tri-peptides réputés pour leur effet antioxydant supérieur (Decker *et al.*, 2001 ; Wu *et al.*, 2003 Hernandez-Ledesma *et al.*, 2005). En effet, la génération des acides aminés libres durant l'hydrolyse extensive ne peut pas traduire l'effet synergique comme l'aurait fait les di- et tri-peptides. Donc cet effet existe mais il est inapparent dans ce cas. La décision finale peut uniquement être établie sur la base d'une analyse de la composition des hydrolysats qui confirmerait la suggestion la plus correcte.

Notons que dans le cas où la première suggestion est vérifiée, nous pourrions conclure que les deux dernières heures de l'hydrolyse ont un impact important sur le profil peptidique des hydrolysats et par conséquent sur leur activité anti-oxydante. Un même raisonnement pourrait aussi convenir au résultat obtenu avec la combinaison pepsine-chymotrypsine.

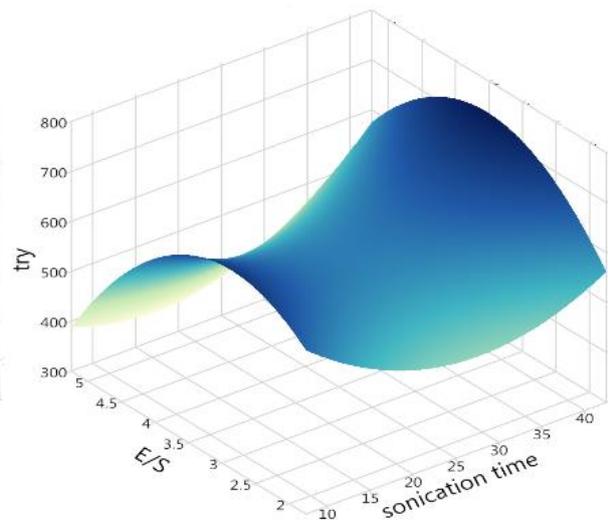
Par ailleurs, le fait de combiner la chymotrypsine avec la trypsine paraît être bénéfique, puisque la valeur CUPRAC du complexe est supérieure à celle obtenue avec la trypsine seule. Ceci confirme l'action synergique de ces deux enzymes qui sont actives au même pH où notamment, il est rapporté que la trypsine stimule l'action de la chymotrypsine par coupure hydrolytique de la chaîne polypeptidique du chymotrypsinogène (Roverly, 1956 ; Zhou *et al*, 2011).

Les figures 44 et 45 illustrent, respectivement, l'effet des variables sur l'activité anti-oxydante des hydrolysats obtenus avec les enzymes seules ou combinées à travers une les profils de surface en trois dimensions.

A.



B.



C.

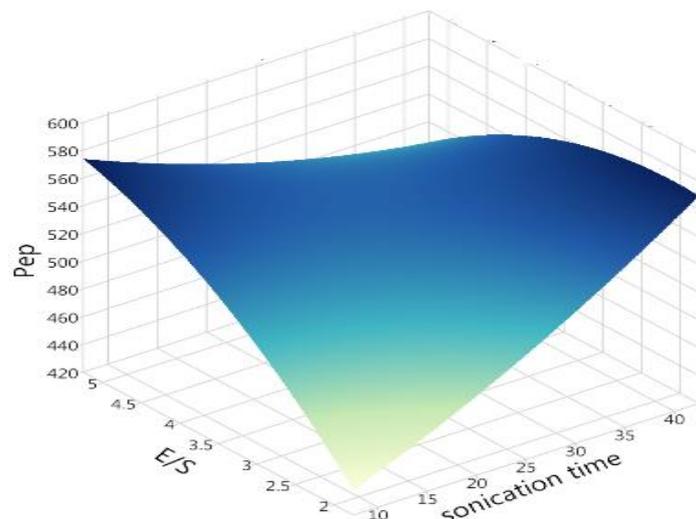


Figure 44 : Profils de surface en 3D présentant la variation simultanée des variables : ratio *E:S* et temps de sonication sur l'activité anti-oxydante obtenue avec l'hydrolyse enzymatique ; chymotrypsique (A), trypsique (B) et pepsique (C).

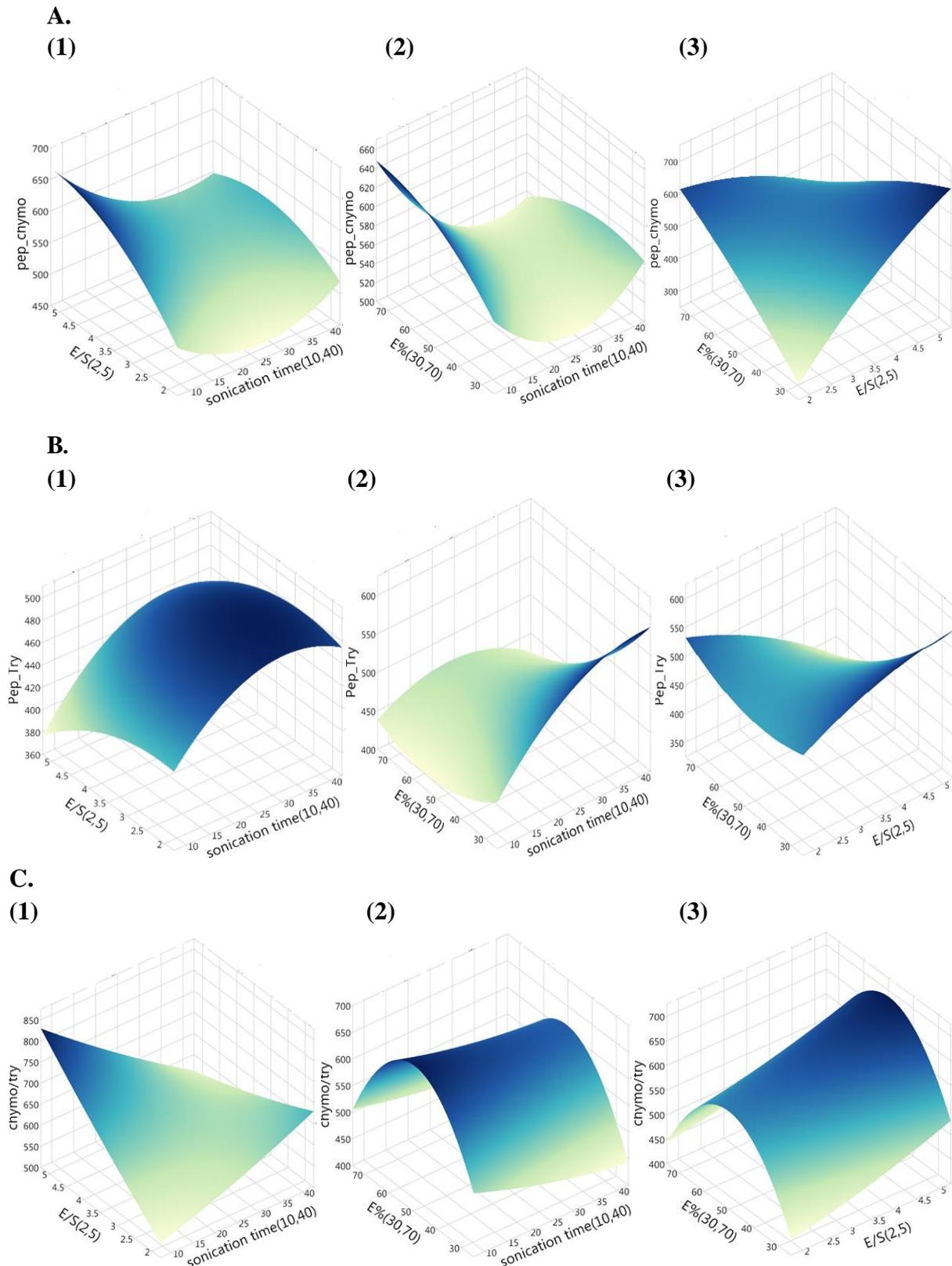


Figure 45 : Profils de surface en 3D présentant la variation simultanée des variables : ratio $E:S$ avec le temps sonication (1), le ratio $E1:E2$ avec le temps de sonication (2), et le ratio $E1:E1$ avec le ratio $E:S$ (3) sur l'activité anti-oxydante obtenue avec l'hydrolyse enzymatique combinée de la pepsine-chymotrypsique (A), pepsine-trypsique (B) et chymotrypsine-trypsine (C).

3.4. Evaluation de l'activité anti-oxydante des hydrolysats des protéines

L'activité anti-oxydante des hydrolysats des protéines du lactosérum bovin a été évaluée aussi bien sous des conditions constantes que variables (Tableau XXX). L'hydrolyse est réalisée à une concentration de substrat (5.01 mg mL^{-1}), pH (2.0 pour la pepsine et pH 8.0 pour la chymotrypsine et trypsine), pendant 24 h. Les autres paramètres de l'hydrolyse à savoir le temps de sonication, le ratio *E:S* et le ratio des enzymes combinées *E1:E2* ont varié en fonction du plan expérimental. L'activité anti-oxydante est également mesurée sous les conditions optimales obtenues pour chaque modèle. Toutes les mesures sont accompagnées d'un contrôle constitué du substrat sans enzymes.

La mesure de l'activité anti-oxydante du contrôle a aboutie à des valeurs inférieures à celles de tous les hydrolysats. Ce résultat est en accord avec ceux des autres auteurs qui rapportent une capacité anti-oxydante des hydrolysats plus élevée par rapport à celle des protéines natives (Jin *et al.*, 2020). Ce résultat constitue la première étape de validation des données.

Les résultats de l'activité anti-oxydante des hydrolysats indiquent que l'action de la chymotrypsine est plus efficace en terme d'activité anti-oxydante par rapport aux autres enzymes seules ou combinées. Ceci conduit à l'obtention d'un meilleur profil peptidique et à une valeur CUPRAC plus élevée évaluée à $(815.33 \pm 0.52) \mu\text{M}$ équivalent de cystéine L^{-1} , comparativement à celle obtenue par la combinaison chymotrypsine-trypsine (771.67 ± 0.68), trypsine (680.00 ± 0.98), pepsine-chymotrypsine (668.00 ± 1.05), pepsine (575.00 ± 0.55) et pepsine-trypsine (533.00 ± 0.75).

Ces résultats sont en accord avec ceux de León-Espinosa *et al.* (2021). L'activité anti-oxydante des hydrolysats chymotrypsiques obtenue par ces auteurs est supérieure à celle des hydrolysats pepsiques obtenus sur l'albumine sérique bovine (BSA) à un ratio molaire (1:10), pH 7.8 (chymotrypsine) et pH 2.0 (pepsine) pendant 4 h. Dans une autre étude, l'activité anti-oxydante des enzymes digestives seules a été obtenue dans l'ordre décroissant : chymotrypsine > trypsine > pepsine par Adjonu *et al.* (2013), qui ont opéré à un pH 2.6 (pepsine) et pH 7.8 (chymotrypsine et trypsine), *E:S* (1:40) pendant 24 h, avec un prétraitement thermique préalable de la BSA.

3.5. Activité anti-oxydante des hydrolysats des protéines sériques issues des laits de différentes espèces

Une comparaison de l'activité anti-oxydante des protéines sériques des laits ovin, caprin et camelin a été conduite sous les conditions optimales relatives aux modèles du lactosérum bovin. Les résultats (Tableau XXXI) montrent un ordre d'activité anti-oxydante différent à travers les enzymes et espèces utilisées. Tout comme les hydrolysats bovins, la valeur CUPRAC la plus élevée est obtenue avec la chymotrypsine pour les hydrolysats caprin et ovin. Cependant, la valeur CUPRAC la plus élevée des hydrolysats camelin est observée en utilisant le complexe pepsine-chymotrypsine. Ce dernier résultat est en accord avec les conclusions de Salami *et al.*, (2010) qui ont observé une activité anti-oxydante 40% supérieure à celle des hydrolysats bovins.

Tableau XXX : Conditions optimales obtenues avec l'hydrolyse enzymatique simple et combinée des enzymes digestives en utilisant un plan factoriel complet et un plan Box-Behnken.

		Plan factoriel complet			Plan Box-Behnken		
		Chymotrypsine	Trypsine	Pepsine	Chymotrypsine-trypsine	Pepsine-chymotrypsine	Pepsine-trypsine
Paramètres constants	pH	8.0	8.0	2.0	8.0	2.0/8.0	2.0/8.0
	[substrat] (mg mL⁻¹)	5.1	5.1	5.1	5.1	5.1	5.1
	Température (°C)	37	37	37	37	37	37
	Temps total (h)	24	24	24	24	2/22	2/22
Paramètres variables	Temps de sonication (min)	40	40	10	10	10	40
	E:S (%)	2.81	3.5	5	5	5	5
	E1:E2 (%)	/	/	/	49.3:50.7	30:70	30:70

Tableau XXXI : Valeurs CUPRAC des hydrolysats caprins, ovins et camelins obtenues sous les conditions optimales de chaque modèle enzymatique.

	CUPRAC (μM Cys L ⁻¹)		
	Caprin	Ovin	Camelin
Chymotrypsine	813.00±0.28	694.00±0.01	704.67±0.96
Trypsine	584.00±2.79	552.50±0.73	647.33±0.10
Chymotrypsine-Trypsine	657.00±0.84	636.50±1.79	588.50±0.33
Pepsine-Chymotrypsine	575.67±1.53	548.00±0.87	728.50±0.09
Pepsine-Trypsine	479.00±1.04	547.00±0.43	696.33±0.65
Pepsine	532.00±0.89	446.50±0.23	476.50±0.45

Les valeurs présentées sont les moyennes calculées ± l'écart type.

La particularité de la fraction protéique du sérum de ce lait en serait l'une des principales explications à ce taux élevé. En effet, plusieurs auteurs ont mentionné que le lactosérum du lait camelin, contient les protéines analogues aux laits des autres espèces, à l'exception de la β -Lactoglobuline. Il se différencie néanmoins par sa richesse en protéines à effet anti-microbien puissant (Lactoferrine/ Lysozyme/ Lactoperoxydase), sa teneur plus élevée en composant-3 des protéose-peptones et surtout l'existence en son sein de protéines spécifiques non décrites dans les laits des autres espèces, notamment la protéine basique (Camel whey basic protein, CWBP), la protéine acide (Whey acidic protein, WAP) et la nouvelle protéine (Novel Whey Protein, NWP). Ces dernières, qui ont entre 15 et 20 kDa, sont susceptibles d'être coupées par les enzymes protéolytiques et induire des peptides à effet anti-antioxydants importants (Beg *et al.*, 1986 ; Elagamy *et al.*, 1996 ; Kappeler, 1998 ; Mati *et al.*, 2017).

3.6. Degré d'hydrolyse enzymatique (DH)

Le degré d'hydrolyse (DH) est utilisé comme une indication de l'étendue de la dégradation des protéines. Le DH des hydrolysats avec les différentes enzymes utilisées a été mesuré dans leurs conditions optimales. Pour les hydrolysats bovins, les valeurs varient entre (01,90 \pm 0,16%) et (11,59 \pm 0,01%) et l'ordre décroissant est établi comme suit : chymotrypsine>trypsine>chymotrypsine-trypsine>pepsine-chymotrypsine>pepsine-trypsine>pepsine.

S'agissant des hydrolysats des protéines des laits caprin, ovin et camelin, les résultats ont donné d'autres intervalles et ordres. Les valeurs de DH des hydrolysats obtenus avec la pepsine sont les plus faibles pour toutes les espèces et celles obtenues avec la chymotrypsine sont les plus élevées. Cette observation est comparable à celle signalée par Théolier *et al.* (2013) (Tableau XXXII).

Tableau XXXII : Degré d'hydrolyse des hydrolysats bovin, caprin, ovin et camelin obtenus sous les conditions optimales de chaque modèle enzymatique.

	DH%			
	Bovin	Caprin	Ovin	Camelin
Chymotrypsine	11.59 \pm 0.01	10.57 \pm 0.01	10.37 \pm 0.90	12.00 \pm 0.70
Trypsine	10.90 \pm 0.01	10.34 \pm 0.05	13.00 \pm 0.01	11.16 \pm 0.18
Chymotrypsine-Trypsine	07.65 \pm 0.00	09.75 \pm 0.08	12.82 \pm 0.53	09.52 \pm 0.10
Pepsine-Chymotrypsine	06.89 \pm 0.02	07.46 \pm 0.03	07.45 \pm 1.20	05.14 \pm 0.36
Pepsine-Trypsine	05.20 \pm 0.01	08.11 \pm 0.02	06.11 \pm 0.67	11.16 \pm 0.02
Pepsine	01.90 \pm 0.16	02.35 \pm 0.04	02.85 \pm 0.20	02.81 \pm 0.25

Les valeurs présentées sont les moyennes calculées \pm l'écart type.

Dans l'ensemble, les valeurs du DH obtenues se situent dans l'intervalle [5.5 , 24.0]% rapporté par la littérature, à l'exception des valeurs du DH des hydrolysats pepsiques obtenus qui sont très faibles (< 3%) (van der Ven *et al.*, 2001). Ce résultat pourrait être attribué à la nature de la structure globulaire des protéines sériques qui limiterait l'accès de la pepsine à leurs sites spécifiques d'hydrolyse. Bien que la sonication soit utilisée comme prétraitement afin d'améliorer l'interaction enzymatique, il apparaît que le temps de sonication utilisé (10 min) ne soit pas suffisant pour induire une ouverture significative dans la structure protéique.

Toutefois, [Adjonu et al. \(2013\)](#) ont obtenu la valeur du DH la plus élevée avec la pepsine par rapport à celle de la chymotrypsine et de la trypsine en utilisant un traitement thermique au lieu de la sonication. Cela étant, la spécificité enzymatique, les conditions opératoires de l'hydrolyse (pH, E:S, [substrat], le prétraitement, le temps d'hydrolyse ainsi que la méthode de mesure du DH) sont les facteurs responsables des différences observées entre les auteurs ([Pihlanto-Leppälä et al., 2000b](#) ; [Spellman et al., 2003](#) ; [Peng et al., 2009](#)).

En fonction de l'origine du lactosérum et des enzymes, nous observons dans cette étude tantôt une concordance tantôt une divergence entre les résultats du DH et ceux de la CUPRAC. Par exemple, Dans le cas des hydrolysats bovins, les valeurs du DH et de la CUPRAC pour la chymotrypsine et la pepsine-chymotrypsine occupent les mêmes positions 1^{ère} et 4^{ème} parmi les six modèles étudiés. Cependant, un ordre différent est obtenu avec la trypsine, chymotrypsine-trypsine, pepsine-trypsine et pepsine qui sont classées 2^{ème}, 3^{ème}, 5^{ème}, 6^{ème} avec les résultats du DH, versus 3^{ème}, 2^{ème}, 6^{ème} et 5^{ème} avec les résultats de la CUPRAC. Ces différences sont raisonnables car le DH reflète le progrès de la réaction à travers le suivi de la cinétique d'hydrolyse et non pas la composition réelle des hydrolysats et leurs propriétés ([Aase Kristoffersen et al., 2019](#)).

L'activité anti-oxydante dépend des propriétés des séquences d'acides aminés dérivées qui sont fonction de la spécificité enzymatique ([Pihlanto, 2006](#)). De plus, les hydrolysats ayant le même DH peuvent avoir différents profils peptidiques et être dotés de diverses bio-activités ([Mullally et al., 1994](#) ; [Mutilangi et al., 1995](#) ; [Smyth et Fitzgerald, 1998](#)). Par ailleurs, nous attribuons la même explication aux hydrolysats obtenus avec les autres espèces qui montrent une tendance similaire. Néanmoins, l'information complète concernant les antioxydants de ces hydrolysats nous a conduit à avoir recours à une analyse poussée par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS), dont nous n'avons pas encore les résultats, en plus de la détermination du DH et la CUPRAC.

3.7. Contrôle de l'hydrolyse des protéines par électrophorèse en PAGE-SDS

Afin de voir si les protéines testées ont bel et bien été hydrolysées selon les conditions optimales arrêtées (notamment au bout de 24 h d'incubation), nous avons examiné les préparations avant et après hydrolyse, par électrophorèse en PAGE-SDS. La [figure 46](#) illustre les profils où nous pouvons relever qu'après 24 h d'incubation, l'ensemble des protéines majeures a été dégradé et aucune bande de migration intense ne subsiste dans les différentes pistes, quelques soient l'enzyme, la combinaison d'enzyme et l'espèce d'origine du lait considérées.

Les résultats de la protéolyse rapportés dans la littérature sont assez similaires à ces conclusions. Le degré de digestion des protéines sériques est fonction du type d'enzyme utilisé ainsi que des conditions d'hydrolyse. Par exemple, une digestion totale est observée avec une hydrolyse de 6 h en utilisant la papaine ([Pena-Ramos et Xiong, 2001](#)). Par contre, pour un temps d'hydrolyse similaire [Pena-Ramos et Xiong, \(2002\)](#) ont observé une digestion partielle des protéines sériques avec la trypsine et la chymotrypsine.

Même si ce n'est pas l'objet à proprement parler de ces essais, nous aurions pu essayer de mettre en évidence les fragments protéiques issus de l'hydrolyse en réalisant une cinétique avec plusieurs temps d'incubation. Sauf que pour le faire il faut réaliser un gradient de porosité en

gel de polyacrylamide, en disposant d'un petit formeur de gradient (chose que nous n'avions pas pour le moment au laboratoire). Ceci pourrait être intéressant pour ne pas avoir à fixer de façon aléatoire le temps d'incubation, surtout qu'en la matière la nature des protéines peut différer selon l'espèce considérée et les sites potentiels de coupure avec.

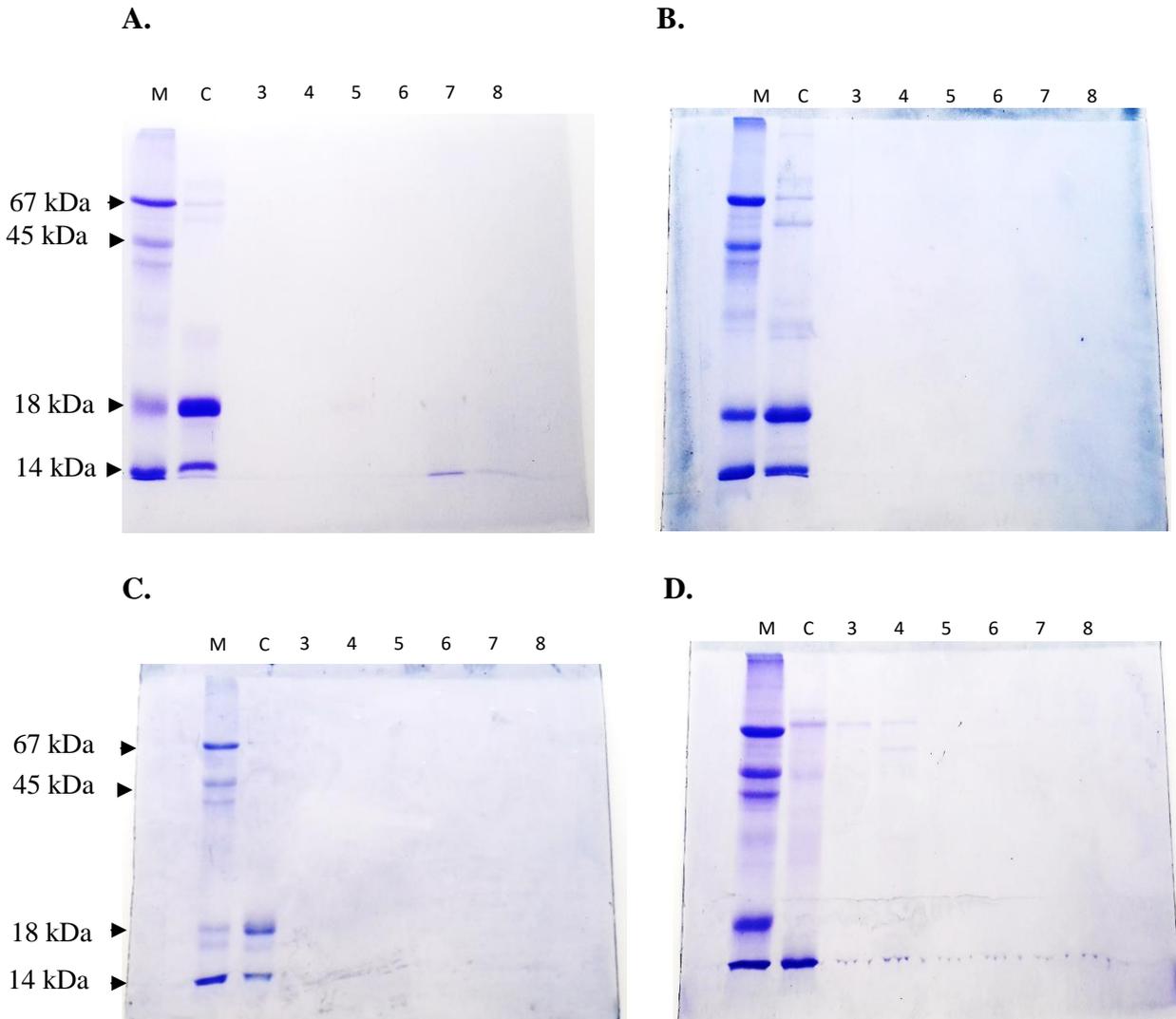


Figure 46 : Profils électrophorétiques sur gel de polyacrylamide en PAGE-SDS (15%, C=2.7%) des hydrolysats de lactosérum bovin (A), caprin (B), ovin (C) et camelin (D). M : marqueur de PM, C : contrôle (lactosérum avant hydrolyse), 3, 4, 5, 6, 7, 8 sont les hydrolysats chymotrypsique (40 min sonication, 2,81% *E:S*), tryptique (40 min sonication, 3.5% *E:S*), pepsique (10 min sonication, 5% *E:S*), chymotrypsique-trypsique (10 min sonication, 5% *E:S*, 49.3:50.7% *E1:E2*), pepsique-chymotrypsique (10 min sonication, 5% *E:S*, 30:70% *E1:E2*), et pepsique-trypsique (40 min sonication, 5% *E:S*, 30:70% *E1:E2*). L'hydrolyse est réalisée à une concentration de substrat 5.01 mg mL^{-1} , pH 2.0 pepsine, et pH 8.0 chymotrypsine et trypsine pendant 24 h.
Kit des Protéines étalons : Albumine Sérique Bovine (67 kDa),: Ovalbumine (45 kDa) ,: β -Lactoglobuline (18 kDa),: α -Lactalbumine (14 kDa).

Par ailleurs, ces résultats sont comparés à ceux obtenus dans une étude préliminaire qui vise à déterminer le temps d'hydrolyse avec chacune des enzymes dans l'hydrolyse séquentielle. Pour cela, nous avons réalisé des gels électrophorétiques en PAGE-SDS à différents temps d'incubation, allant de 15 min à 24 h afin de bien visualiser l'effet des enzymes (à différents ratios) sur les protéines considérées. A partir des profils électrophorétiques 47, 48 et 49 nous relevons des différences au niveau de la sensibilité des protéines sériques vis-à-vis des enzymes utilisées. La pepsine est l'enzyme qui possède un fort pouvoir de dégradation, particulièrement sur la BSA. La chymotrypsine a une action plus marquée sur la β -Lg et plus faiblement sur l' α -La. Quant à la trypsine, les profils électrophorétiques indiquent qu'elle a une action faible sur ces protéines. Elles ne dégradent la β -Lg qu'à des temps d'incubation de plus de 4 h et à des ratios de 4%.

Cette hydrolyse séquentielle permet d'entrevoir des combinaisons efficaces si, bien entendu, on souhaite une dégradation poussée et l'obtention de petits peptides au détriment des polypeptides. Il est à noter que les différentes protéines sont dégradées entièrement au bout de 24 h d'incubation dans les conditions optimales, ce qui justifie le bien fondé des modèles retenus.

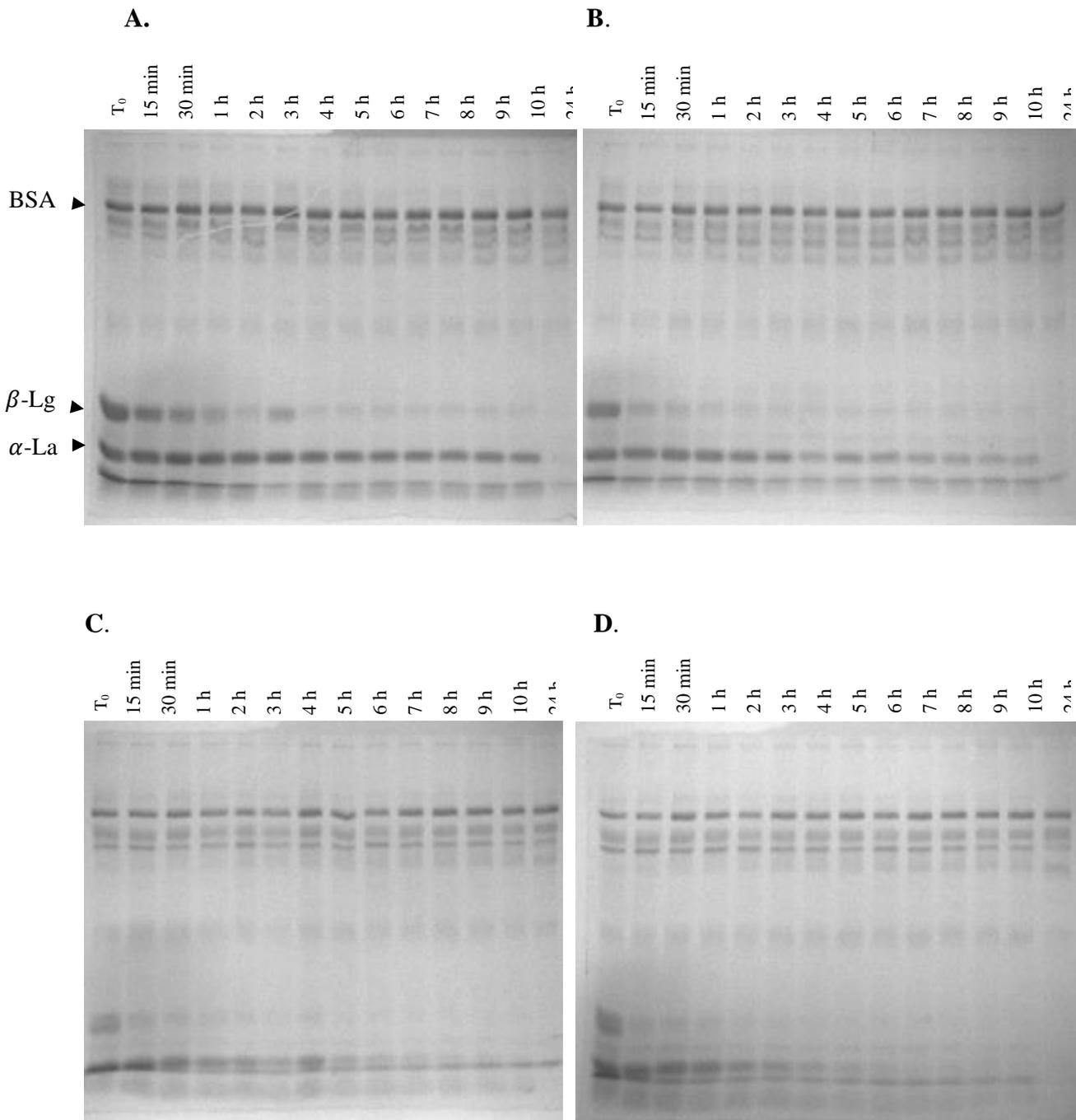


Figure 47 : Profils électrophorétiques sur gel de polyacrylamide en PAGE-SDS (15%, C=2,7%) des protéines sériques du lait bovin hydrolysées avec la chymotrypsine à différents ratios (2%, A), (3%, B), (4%, C), (5%, D). Une cinétique d'hydrolyse est réalisée à différents temps d'incubation (de 15 min à 24h).

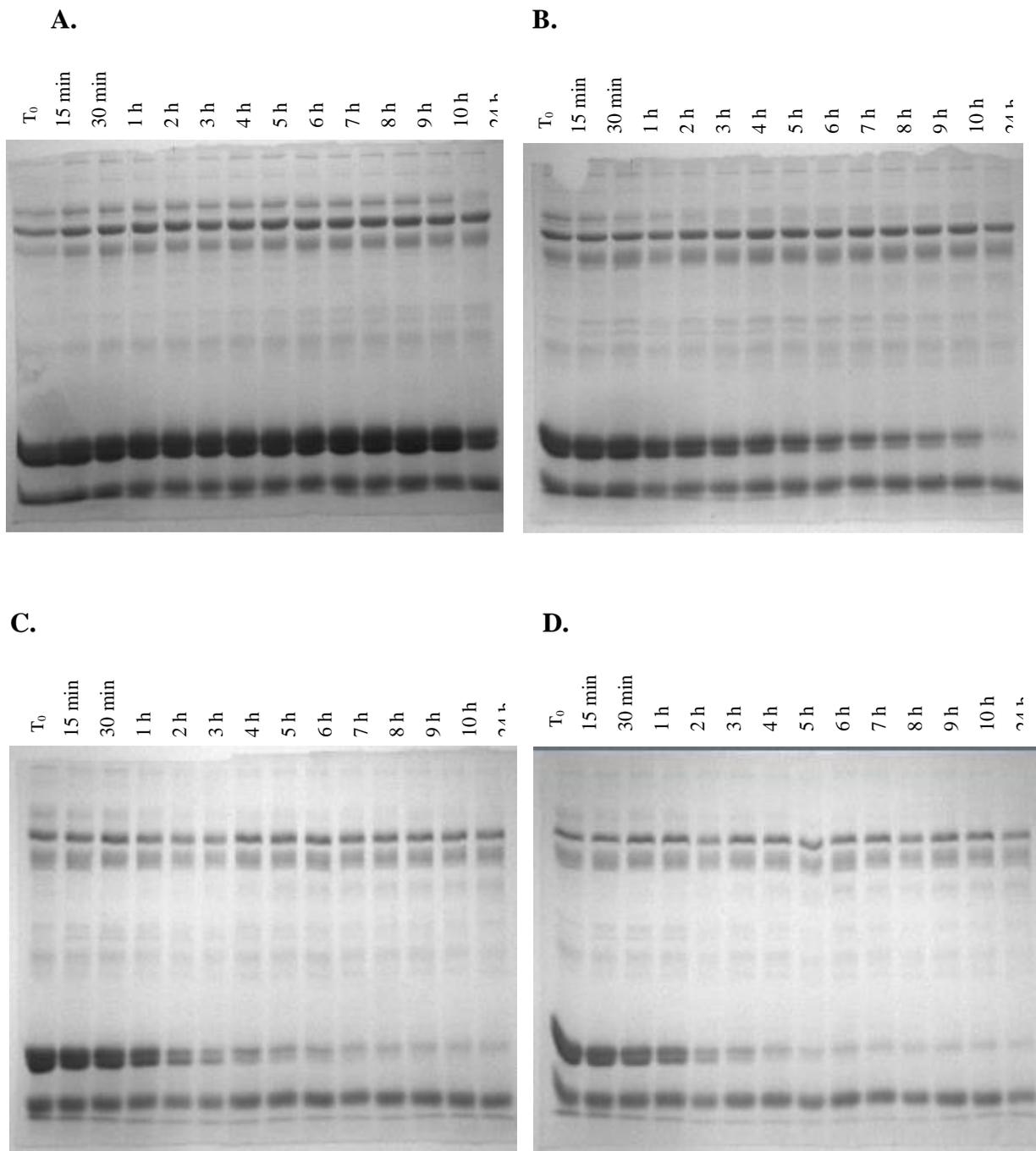


Figure 48 : Profils électrophorétiques sur gel de polyacrylamide en PAGE-SDS (15%, C=2,7%) des protéines sériques du lait bovin hydrolysées avec la trypsine à différents ratios (2%, A), (3%, B), (4%, C), (5%, D). Une cinétique d'hydrolyse est réalisée à différents temps d'incubation (de 15 min à 24h).

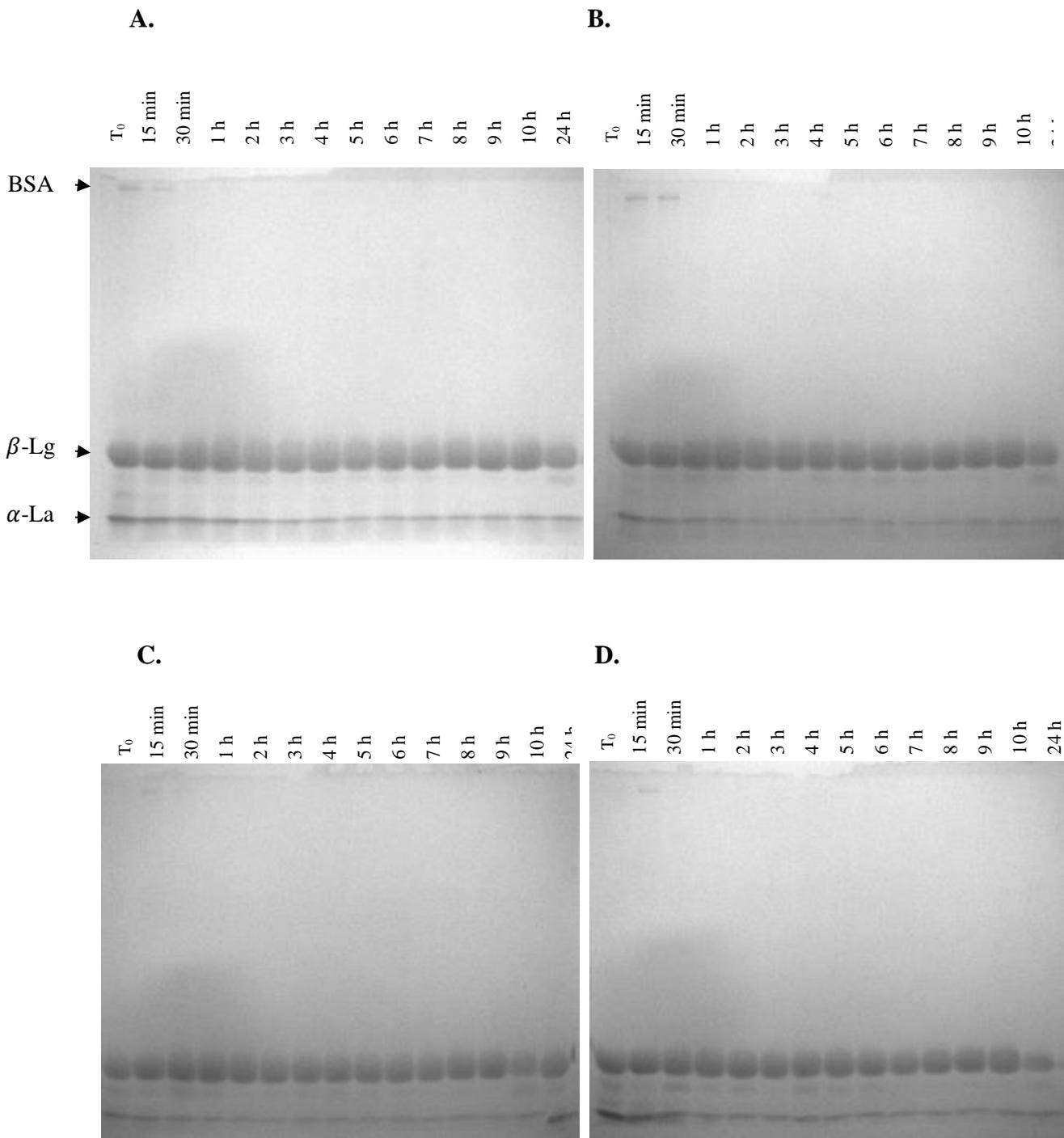


Figure 49 : Profils électrophorétiques sur gel de polyacrylamide en PAGE-SDS (15%, C=2,7%) des protéines sériques du lait bovin hydrolysées avec la pepsine à différents ratios (2%, A), (3%, B), (4%, C), (5%, D). Une cinétique d'hydrolyse est réalisée à différents temps d'incubation (de 15 min à 24 h).

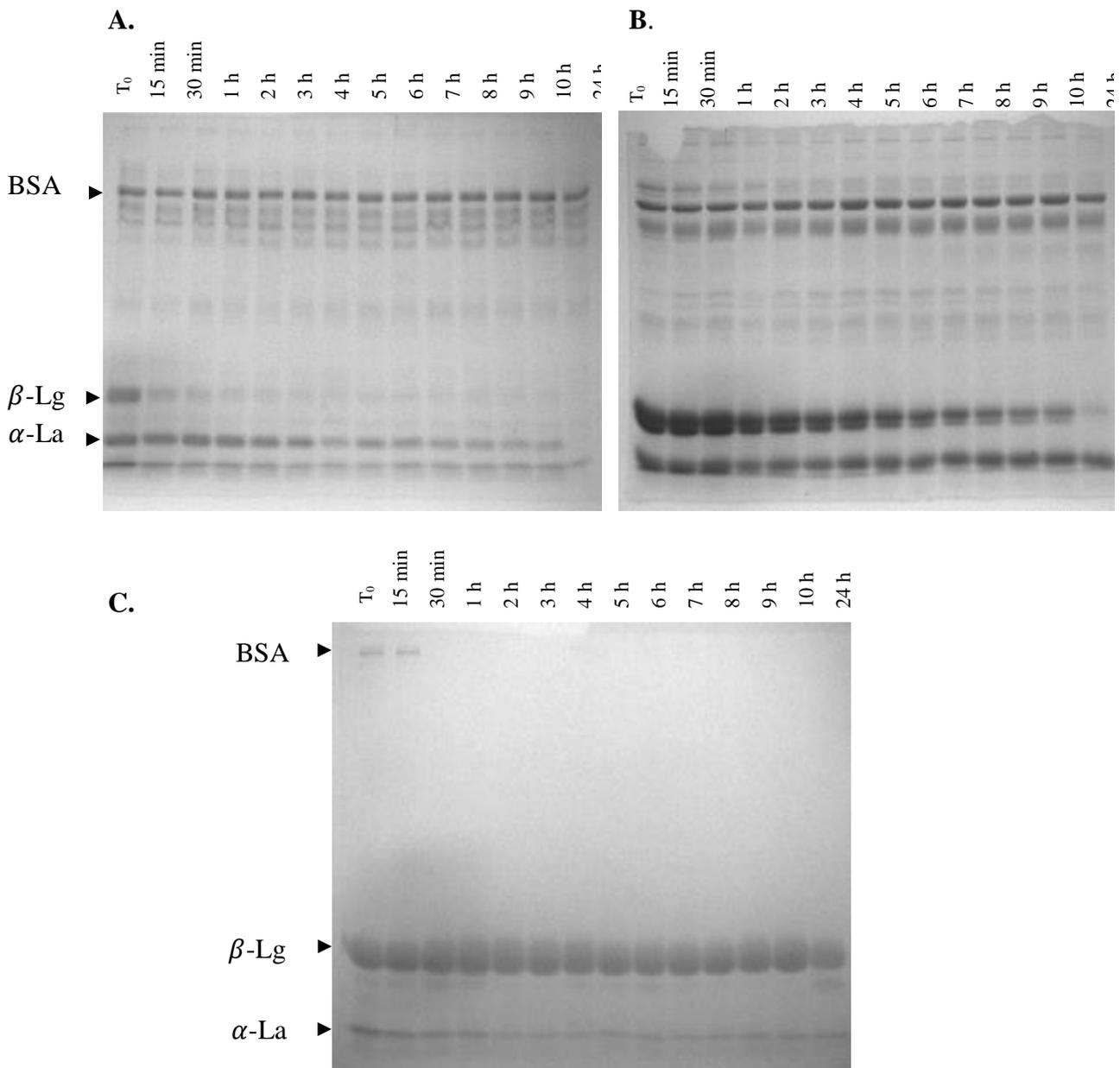


Figure 50 : Profils électrophorétiques sur gel de polyacrylamide en PAGE-SDS (15%, C=2,7%) des protéines sériques du lait bovin hydrolysés par différentes enzymes (A : chymotrypsine ; B : trypsin ; C : pepsine), dans les mêmes conditions (*E:S* 2%, pH, température et temps de sonication 3.5 min). La cinétique d'hydrolyse est réalisée à différents temps d'incubation (de 15 min à 24 h).

3.8. Conclusion

Dans ce chapitre, l'hydrolyse enzymatique avec la chymotrypsine, la trypsine et la pepsine seules ou en mélange est réalisée selon un plan factoriel complet et un plan Box-Behnken, respectivement. L'efficacité des modèles enzymatiques à générer des hydrolysats ayant la meilleure activité anti-oxydante est testée en utilisant la méthode CUPRAC. D'autres analyses telles que le DH et l'électrophorèse en PAGE-SDS sont réalisées afin de chercher une éventuelle corrélation avec les résultats de la CUPRAC.

Par ailleurs, l'effet des paramètres d'hydrolyse (ratio *E:S*, ratio *E1:E2*, prétraitement des protéines sériques) a été étudié et la valeur optimale pour chaque paramètre est déterminée. Nous avons également appliqué les conditions optimales obtenues avec l'hydrolyse enzymatique des protéines sériques bovines à celles des laits d'autres espèces dans le but de comparer le potentiel antioxydant des différents hydrolysats.

Globalement, un effet significatif est obtenu avec les paramètres d'hydrolyse sur l'activité anti-oxydante des hydrolysats. La chymotrypsine a permis l'obtention d'hydrolysats avec l'activité anti-oxydante la plus élevée. Un résultat similaire est observé avec les espèces caprine et ovine. Cependant, la meilleure valeur CUPRAC est obtenue en utilisant la combinaison pepsine-chymotrypsine pour les hydrolysats du lactosérum camelin.

Cette présente étude est actuellement poursuivie dans le cadre d'une convention de coopération afin de réaliser une caractérisation des différents fragments d'hydrolyse obtenus et l'identification des peptides qui sont générés.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Les sous-produits industriels représentent actuellement, à la fois un intérêt croissant, du fait de leur composition en molécules bioactives aux effets bénéfiques et, un challenge de leur gestion, en raison des grandes quantités générées par les industries agroalimentaires. L'un des moyens d'y remédier est de les exploiter pour les atouts qu'ils présentent où plusieurs investigations ont montré des propriétés attrayantes des composés bioactifs retrouvés dans les sous-produits de diverses sources.

Partant de ces éléments, cette étude s'est proposée de réaliser une optimisation du processus d'obtention des composés antioxydants provenant des sous-produits oléicoles, particulièrement des feuilles d'olivier, mais aussi des protéines sériques bovines en ayant recours à la méthode des surfaces de réponses (RSM). Pour cela, le plan Box-Behnken a été adopté en utilisant les solvants eutectiques profonds à base de glycérol et d'acides aminés (lysine, proline, arginine). Il est notable que ces solvants présentent un caractère biodégradable, non toxique et sont relativement peu coûteux.

Les contenus en polyphénols totaux des extraits obtenus, dans les conditions optimales $R_{L/S}$ (150 mL g⁻¹, C_{DES} (90 %, w/v) et T (80 °C) sont évalués à 188.39, 100.01 et 95.97 mg g⁻¹ GAE (matière sèche), correspondant respectivement aux solvants : glycérol-lysine, glycérol-arginine et glycérol-proline. Par ailleurs, les valeurs expérimentales se rapprochent des valeurs prédites sous de telles conditions. Le solvant glycérol-lysine s'est avéré le plus efficace pour l'extraction des composés polyphénoliques des feuilles d'olivier comparé aux solvants glycérol-arginine et glycérol-proline, ainsi que les solvants conventionnels éthanol (70% v/v), méthanol (70% v/v) et eau. Les résultats ont montré que l'extraction avec le solvant glycérol-lysine a permis un rendement en polyphénols de 40.32, 54.83, 64, 66.01 et 71.09% fois supérieurs à celui obtenu avec les solvants glycérol-arginine, glycérol-proline, éthanol (70%), méthanol (70%) et l'eau, respectivement.

De plus, l'analyse de la chromatographie liquide à barrette d'iode couplée à la spectrométrie de masse a permis de mettre en évidence la capacité du solvant glycérol-lysine à extraire le maximum de polyphénols ainsi que sa sélectivité envers les composés phénoliques quantifiés. De manière générale, les DESs utilisés dans cette étude ont révélé une extraction favorable et excessive du tyrosol par rapport aux études précédentes. Cependant des différences plus ou moins importantes ont été observées avec l'hydroxytyrosol, l'oleuropéine, la lutéoline-7-O-glucoside et la rutine.

Les nouveaux DESs, conçus, synthétisés et testés dans cette étude ont montré leur aptitude dans l'extraction des antioxydants polyphénoliques à partir des feuilles d'olivier. Les résultats obtenus confortent les données de la littérature en réaffirmant l'efficacité des DESs à extraire les polyphénols et en rapportant l'existence d'une corrélation entre l'activité anti-oxydante et la concentration en composés phénoliques.

Au même titre, l'hydrolyse des protéines sériques est optimisée en utilisant la chymotrypsine, trypsine et pepsine. Un plan factoriel complet est appliqué pour les enzymes seules pour évaluer l'effet de deux facteurs indépendants sur l'activité anti-oxydante, à savoir la sonication et le ratio enzyme/substrat. Outre ces deux facteurs, le ratio des enzymes ($E_1:E_2$) est évaluée dans l'hydrolyse enzymatique combinée par le plan Box-Behnken. Les résultats

indiquent que les conditions d'hydrolyse étudiées ont des effets significatifs sur la valeur CUPRAC.

Les conditions optimales obtenues pour le temps de sonication, le ratio *E:S* et le ratio *E1:E2* sont les suivantes : (40 min, 2.81%) pour la chymotrypsine ; (40 min, 3.5%) pour la trypsine ; (10 min, 5%) pour la pepsine ; (10 min, 5%, 49.3%) pour la combinaison chymotrypsine-trypsine, (10 min, 5%, 30%) pour la combinaison pepsine-chymotrypsine et enfin (40 min, 5%, 30%) pour la combinaison pepsine-trypsine.

L'hydrolyse sous les conditions optimales a abouti aux valeurs CUPRAC les plus élevées avec la chymotrypsine, à savoir respectivement : 815.33, 813, 694 $\mu\text{M L}^{-1}$ équivalent de cystéine pour les protéines sériques bovines, caprines, et ovines. Cependant, la valeur CUPRAC la plus élevée dans le cas des protéines sériques camelines est obtenue avec le modèle pepsine-chymotrypsine (728.5 $\mu\text{M L}^{-1}$ équivalent de cystéine). Ces résultats suggèrent la convenance du modèle de la chymotrypsine pour un effet antioxydant optimal dans le cas des protéines sériques bovines, caprines et ovines et le modèle pepsine-chymotrypsine dans le cas des protéines sériques camelines.

L'identification des peptides que nous avons menés dans le cadre de ce chapitre, n'a pas été conduit jusqu'au bout par manque de temps. C'est d'ailleurs la première perspective assignée à ce travail qui consiste à exploiter toutes les données et finaliser cette étude en vue de corréler les hydrolysats à fort pouvoir antioxydant avec les peptides ou polypeptides responsables de cette activité biologique d'intérêt, qui est très prisée dans le domaine de l'agro-alimentaire, pour la préservation des produits, en ayant recours à des substances naturelles au lieu et place d'additifs synthétiques à effets indésirables.

Ayant contribué à lancer les bases de l'élaboration de modèles d'extraction efficaces et peu polluants, nous souhaitons aussi poursuivre ce travail en nous intéressant aux autres sous-produits, particulièrement les margines et les grignons, qui ont un fort pouvoir polluant.

Comme nous projetons enfin de réaliser des essais *in vivo* afin d'étudier la biodisponibilité intestinale des molécules extraites et des hydrolysats obtenus ainsi que des essais cliniques avant leurs applications ultimes, comme ingrédients alimentaires ou dans des compléments pour préparations médicamenteuses, voire aussi dans les produits cosmétiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aase Kristoffersen K., Kristian Afseth N., Böcker U., Lindberg D., de Vogel-van den Bosch H., Linnéa Ruud M., Gizachew Wubshet S. (2019). Average molecular weight, degree of hydrolysis and dry-film FTIR fingerprint of milk protein hydrolysates: Intercorrelation and application in process monitoring. *Food Chemistry*, 310, (doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125800).

Abadía-García L., Castaño-Tostado E., Ozimek L., Romero-Gómez S., Ozuna C., Amaya-Llano, S.L. (2016). Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 84-90.

Abaza L., Talorete T.P.N., Yamada P., Kurita Y., Zarrouk M., Isoda H. (2007). Induction of Growth Inhibition and Differentiation of Human Leukemia HL-60 Cells by a Tunisian Gerboui Olive Leaf extract. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 71(5), 1306-1312.

Abaza L., Taamalli A., Nsir H., Zarrouk M. (2015). Olive Tree (*Olea europaea* L.) Leaves: Importance and Advances in the Analysis of Phenolic Compounds. *Antioxidants*, 4, 682-698.

Abbott A.P., Capper G., Davies D.L., Rasheed R.K., Tambyrajah V. (2003). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical Communications*, 1, 70-71.

Abbott P., Boothby D., Capper G., Davies D.L., Rasheed R.K. (2004). Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids. *American Journal of Chemical Society*, 126, 9142-9147.

Abed El-Salam M.H., El-Shibiny S. (2019). Reduction of Milk Protein Antigenicity by Enzymatic Hydrolysis and Fermentation. A Review. *Food Reviews International*, 37(3), 276-295.

Adjonu R., Doran G., Torley P., Agboola S. (2013). Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: Influence of heat pre-treatment and enzyme specificity. *Food Chemistry*, 136(3-4), 1435–1443.

Adler-Nissen J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 27(6), 1256-1262.

Adler-Nissen J. (1986). Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins. Elsevier Applied Science Publishers, London.

Adler-Nissen J. (1993). Proteases ; in «Enzymes in food processing». Academic Press Inc, 3^{ème} éd., San Diego.

Adler-Nissen J. (1996). Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins. Elsevier Applied Science Publishers, London.

Afaneh I., Yateem H., Al-Rimawi F. (2015). Effect of Olive Leaves Drying on the Content of Oleuropein. *American Journal of Analytical Chemistry*, 6, 246-252.

Ahmad-Qasem M.H., Cánovas J., Barrajon-Catalán E., Micol V., Cárcel, J.A., García-Pérez J.V. (2013). Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. *Serrana*) by using power ultrasound. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 17, 120-129.

Aihara K., Kajimoto O., Hirata H., Takahashi R., Nakamura Y. (2005). Effect of powdered fermented milk with *Lactobacillus helveticus* on subjects with high-normal blood pressure or mild hypertension. *Journal of American College of Nutrition*, 4, 257-265.

Ajit S. (1998). Steps in Bioseparation Processes ; in : « Separation Science and Technology] Bioseparation of Proteins - Unfolding/Folding and Validations Volume 1». Academic Press, 1^{ère} éd., San Diego.

Ajila C.M., Brar S.K., Verma M., Tyagi R.D., Godbout S., Valero J.R. (2011). Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. *Critical Review of Biotechnology*, 31, 227-249.

Alarcon de la Lastra C., Barranco M.D., Motilva V., Herrerias M. (2001). Mediterranean Diet and Health: Biological Importance of Olive Oil. *Current Pharmaceutical Design*, 7 (10), 933-950.

Alburquerque J.A., González J., García D., Cegarra J. (2004). Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology*, 91(2), 195–200.

Almi-Sebbane D., Adt I., Degraeve P., Jardin J., Bettler E., Terreux R., Oulahal N., Mati A. (2018). Casesidin-like anti-bacterial peptides in peptic hydrolysate of camel milk β -casein. *International Dairy Journal*, 86, 49-56.

Alothman M., Hogan S., Hennessy D., Dillon P., Kilcawley K.N., O'Donovan M., Tobin J., Fenelon M.A., O'Callaghan, T.F. (2019). The “Grass-Fed” Milk Story: Understanding the Impact of Pasture Feeding on the Composition and Quality of Bovine Milk. *Foods*, 8(8), 350–373.

Anonyme 1 (2020). Production mondiale du lait. Perspectives agricoles de l'OCDE et de la FAO, Statistiques agricoles de l'OCDE (base de données). OECD-FAO

Anonyme 2 (2020). Répartition de la production mondiale du lait de vache. Perspectives agricoles de l'OCDE et de la FAO, Statistiques agricoles de l'OCDE (base de données). FAO

Anonyme 3 (2022). Production mondiale de l'huile d'olive entre 2016/2017 et 2020/2021. Statistiques agricoles de la Commission Européenne.

Apak R., Güçlü K., Demirata B., Özyürek M., Çelik S.E., Bektaşoğlu B., Berker K.I., Özyurt D. (2007). Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, 12(7), 1496–1547.

Asar Ö., İlk O., Dag O. (2014). Estimating Box-Cox power transformation parameter via goodness of fit tests. *Communications in Statistics Simulation and Computation*, 46, 91-105.

Assenat L. (1991). Composición e propiedades ; in : «Leche y Productos Lácteos: Vaca–Oveja–Cabra». Acribia S.A., Zaragoza.

Athira S., Mann B., Sharma R., Kumar R., Saini P., Singh A. K. (2015). Production and characterization of whey protein hydrolysate having antioxidant activity from cheese whey. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 95, 2908-2915.

Atra R., Vatai G., Bekassy-Molnar E., Balint A. (2005). Investigation of ultra and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. *Journal of Food Engineering*, 67, 325-332.

Aura A-M. (2005). In vitro digestion models for dietary phenolic compounds. *VTT Publications*, 575, 1-107.

Babich H., Visioli F. (2003). In vitro cytotoxicity to human cells in culture of some phenolics from olive oil. *II Farmaco*, 58, 403-407.

Baidez A.G., Gomez P., Del Rio J.A., Ortuno A. (2007). Antifungal capacity of major phenolic compounds of *Olea europaea* L. against *Phytophthora megasperma* Drechsler and *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten. *Physiology Molecular Plant Pathology*, 69(4-6), 224-229.

Baieli M.F., Urtasun N., Martinez M.J, Hirsch D.B., Pilosof A.M., Miranda M.V., Osvaldo Cascone O.J., Wolman F. (2017). Affinity chromatography matrices for depletion and purification of casein glycomacropeptide from bovine whey. *Biotechnology Progress*, 33(1), 171-180.

Bajoub A., Medina-Rodríguez S., Gómez-Romero M., Ajal E.A., Bagur-González M.G., Fernández-Gutiérrez A., Carrasco-Pancorbo A. (2016). Assessing the varietal origin of extra-virgin olive oil using liquid chromatography fingerprints of phenolic compound, data fusion and chemometrics. *Food Chemistry*, 215, 245-255.

Baker E.N., Baker H.M. (2005). Lactoferrin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(22), 2531-2539.

Basavegoda N., Baek K.H. (2021). Synergistic Antioxidant and Antibacterial Advantages of Essential Oils for Food Packaging Applications. *Biomolecules*, 11, 1267-1285.

Battinelli L., Daniele C., Cristiani M., Bisignano G., Saija A., Mazzanti G. (2006). In vitro antifungal and anti-elastase activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. fruit. *Phytomedicine*, 13(8), 558-563.

Beg O. U., Bahr-Lindström H. V., Zaidi Z. H., Jörnvall H. (1986). A camel milk whey protein rich in half-cystine. *European Journal of Biochemistry*, 159, 195-201

Beg O. U., Bahr-Lindström H. V., Zaidi Z. H., Jörnvall H. (1987). Characterization of a heterogeneous camel milk whey non-casein protein. *Federation of European Biochemical Societies*, 216(2), 270-274.

Begum A.N., Nicolle C., Mila I., Lapierre C., Nagano K., Fukushima K., Heinonen S.M., Adlercreutz H., Remesy C., Scalbert, A. (2004). Dietary Lignins Are Precursors of Mammalian Lignans in Rats. *Journal of Nutrition*, 134(1), 120-127.

- Belem M.A.F., Gibbs B.F., Lee B.H. (1999).** Proposing sequences for peptides derived from whey fermentation with potential bioactive sites. *Journal of Dairy Science*, 82, 486-493.
- Belinskaia D.A., Voronina P.A., Batalova A.A., Goncharov N.V. (2021).** Serum Albumin. *Encyclopedia*, 1, 65–75.
- Benavente-García O., Castillo J., Lorente J., Ortuño A., Del Rio J.A. (2000).** Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, 68, 457-462.
- Bendini A., Cerretani L., Carrasco-Pancorbo A., Gomez-Caravaca A.M., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutierrez A., et Lercker G. (2007).** Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils: a Survey of Their Sensory Properties, Health Effects, Antioxidant Activity and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade. *Molecules*, 12(8), 1679-1719.
- Benincasa C., Pellegrino M., Romano E., Claps S., Fallara C., Perri E. (2022).** Qualitative and Quantitative Analysis of Phenolic Compounds in Spray-Dried Olive Mill Wastewater. *Frontiers in Nutrition*, 8, (doi : 10.3389/fnut.2021.782693).
- Benkhalti F., Prost J., Paz E., Perez-Jimenez F., El Modafar C., El boustani E. (2002).** Effects of feeding virgin olive oil or their polyphenols on lipid of rat liver. *Nutrition Research*, 22 (9), 1067-1075.
- Berset C. (2005).** Antioxydants phénoliques-structure, propriétés, sources végétales ; in « Les polyphénols en agroalimentaire ». Editions Techniques & Documentation, 5^{ème} éd., Lavoisier, Paris.
- Bezerra M.A., Santelli R.E., Oliveira E.P., Villar L.S., Escaleira L.A. (2008).** Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76, 965-977.
- Bi W., Tian M., Row K.H. (2013).** Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. *Journal of Chromatography A*, 1285, 22-30.
- Bischoff W., Miller F. (2006).** Optimal designs which are efficient for lack of fit tests. *Annals in Statistics*, 34, 2015-2025.
- Bitler C.M., Viale T.M., Damaj B., Crea, R. (2005).** Hydrolyzed Olive Vegetation Water in Mice Has Anti-Inflammatory Activity. *Journal of Nutrition*, 135, 1475-1479.
- Bogani P., Galli C., Villa M., Visioli, F. (2007).** Post-prandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis*, 190(1), 181-186.
- Bonilla J., Vargas F.C., Gomes de Oliveira T., Makishi G.L.D.A., Sobral P.J.D.A. (2015).** Recent patents on the application of bioactive compounds in food: A short review. *Current Opinion in Food Science*, 5, 1-7.

- Bonnaillie L.M., Tomasula P.M. (2009).** Whey protein fractionation; in : «Whey processing, functionality and health benefits». Wiley-Blackwell Publishing, 1^{ère} éd., Iowa.
- Boussetta N., Vorobiev E., Deloison V., Pochez F., Falcimaigne-Cordin A., Lanoiselle J.L. (2011).** Valorisation of grape pomace by the extraction of phenolic antioxidants: application of high voltage electrical discharges. *Food Chemistry*, 128 (2), 364-370.
- Boussetta N., Vorobiev E., Le L., Cordin-Falcimaigne A., Lanoiselle J.L. (2012).** Application of electrical treatments in alcoholic solvent for poly-phenols extraction from grape seeds. *LWT e Food Science and Technology*, 46(1), 127-134.
- Box G.E.P., Behnken D.W. (1960).** «Some new three level designs for the study of quantitative variables». *Technometrics*, 2, 455-475.
- Brahmi F., Mechri B., Dhibi M., Hammami M. (2013).** Variations in phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Olea europaea* leaves and fruits extracts collected in two different seasons. *Industrial Crops and Production*, 49, 256-264.
- Brandelli A., Daroit D.J., Correa A.P.F. (2015).** Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Research International*, 73, 149-161.
- Brew K., Hill R.L. (1970).** The Isolation and Characterization of the Tryptic, Chymotryptic, Peptic, and Cyanogen Bromide Peptides from Bovine α -Lactalbumin. *Journal of Biological Chemistry*, 245(17), 4659-4569.
- Bubalo M.C., Čurko N., Tomašević M., Ganić K.K., Redovniković I.R. (2016).** Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 200, 159-166.
- Bucić-Kojić A., Planinić M., Tomas S., Bilić M., Veli D. (2007).** Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81, 236-242.
- Budiyanto A., Uahmed N., Wu A., Bito T., Nikaido O., Osawa T., Ueda M., Ichihashi M. (2000).** Protective effect of topically applied olive oil against photocarcinogenesis following UVB exposure of mice. *Carcinogenesis*, 21(11), 2085-2090.
- Byrne D.P., Manandhar S.P., Potempa J., Smalley W.J. (2015).** Breakdown of albumin and haemalbumin by the cysteine protease interpain A, an albuminase of *Prevotella intermedia*. *BMC Microbiology*, 15(1), 185–195.
- Cacace J.E., Mazza G. (2003).** Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59, 379-389.
- Caetano-Silva M. E., Bertoldo-Pacheco M. T., Paes-Leme A. F., Netto F. M. (2015).** Iron-binding peptides from whey protein hydrolysates: Evaluation, isolation and sequencing by LC-MS/MS. *Food Research International*, 71, 132-139.
- Calabriso N., Scoditti E., Pellegrino M., Carluccio M.A. (2015).** Olive oil ; in «The Mediterranean Diet». Elsevier, London.

- Caleja C., Barros L., Antonio A.L., Oliveira M.B.P.P., Ferreira I.C.F.R. (2017).** A comparative study between natural and synthetic antioxidants: Evaluation of their performance after incorporation into biscuits. *Food Chemistry*, 216, 342-346.
- Carciochi R.A. (2017).** Valorization of Agrifood By-Products by Extracting Valuable Bioactive Compounds Using Green Processes ; in « Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food », Elsevier Academic Press Inc, London.
- Casas L., Mantell C., Rodríguez M., de la Ossa E.M., Roldán A., De Ory I., Blandino A. (2010).** Extraction of resveratrol from the pomace of Palomino fino grapes by supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, 96 (2), 304-308.
- Cejudo B, C., Cran M.J., Casas C, L., Serrano C.M., Bigger S.W. (2022).** Mass Transfer and Optical Properties of Active PET/PP Food-Grade Films Impregnated with Olive Leaf Extract. *Polymers*, 14, 84-99.
- Çekiç S.D., Sözgen Başkan K., Tütem E., Apak R. (2009).** Modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay for measuring the antioxidant capacities of thiol-containing proteins in admixture with polyphenols. *Talanta*, 79, 344-351.
- Chakroun D., Grigorakis S., Loupassaki S., Makris D.P. (2021).** Enhanced-performance extraction of olive (*Olea europaea*) leaf polyphenols using L-lactic acid/ammonium acetate deep eutectic solvent combined with β -cyclodextrin: Screening, optimisation, temperature effects and stability. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 11(4), 1125-1136.
- Chandrapala J., Zisu B., Palmer M., Kentish S., Ashokkumar M. (2011).** Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(5), 951-957.
- Chaud M.V., Izumi C., Nahaal Z., Shuhama T., Bianchi M.D.L.P., Freitas O.D. (2002).** Iron derivatives from casein hydrolysates as a potential source in the treatment of iron deficiency. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 50, 871-877.
- Chavan R.S., Shraddha R.C., Kumar A., Nalawade T. (2015).** Whey Based Beverage: Its Functionality, Formulations, Health Benefits and Applications. *Journal of Food Processing & Technology*, 6(10), 495-503.
- Chen H.M., Muramoto K., Yamauchi F., Nokihara K. (1996).** Antioxidant activity of design peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 44, 2619-2623.
- Chen H.M., Muramoto K., Yamauchi F., Fujimoto K., Nokihara K. (1998).** Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 46, 49-53.
- Chen G.W., Tsai J.-S., Sun Pan B. (2007).** Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides and antihypertensive effect of milk produced by protease-facilitated lactic fermentation. *International Dairy Journal*, 17, 641-647.

Cheng Y., Donkor P.F., Yeboah G.B., Ayim I., Wu J., Ma H. (2021). Modulating the in vitro digestion of heat-set whey protein emulsion gels via gelling properties modification with sequential ultrasound pretreatment. *LWT*, 149, (doi : 10.1016/j.lwt.2021.111856).

Cicatiello C., Franco S., Pancino B., Blasi E. (2016). The value of food waste: An exploratory study on retailing. *Journal of Retailing and Consumer Services*, 30, 96-104.

Cicerale S., Lucas L., Keast R. (2010). Biological Activities of Phenolic Compounds Present in Virgin Olive Oil. *International Journal of Molecular Science*, 11(2), 458-479.

Cichosz G., Czczot H., Ambroziak A., Bielecka Marika M. (2017). Natural antioxidants in milk and dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 70(2), 165-178.

Cieřlik E., Gręda A., Adamus W. (2006). Contents of polyphenols in fruit and vegetables. *Food Chemistry*, 94(1), 135–142.

Cittan M., Çelik A. (2018). Development and Validation of an Analytical Methodology Based on Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry for the Simultaneous Determination of Phenolic Compounds in Olive Leaf Extract. *Journal of Chromatographic Science*, 56, 336-343.

Claeys W.L., Verraes C., Cardoen S., De Block J., Huyghebaert A., Raes K. (2014). Consumption of raw or heated milk from different species: an evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control*, 42, 188–201.

Conti A., Godovac-Zimmermann J., Napolitano L., Liberatori J. (1985). Identification and characterization of two α -lactalbumin from Somali camel milk (*Camelus dromedarius*). *Milchwissenschaft*, 40(11), 673-675.

Coni E., Di Benedetto R., Di Pasquale M., Masella R., Modesti D., Mattei R., Carlini E.A. (2000). Protective Effect of Oleuropein, an Olive Oil Biophenol, on Low Density Lipoprotein Oxidizability in Rabbits. *Lipids*, 35(1), 45-54.

Contreras M.M., Hernández-Ledesma B., Amigo L., Martín-Álvarez P.J., Recio I. (2011). Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *LWT, Food Science & Technology*, 44, 9-15.

Cordero, J.G., García-Escudero R.A., Jesús. G., Ricardo G.E., Vega. (2018). Benefit of Oleuropein Aglycone for Alzheimer’s disease by Promoting Autophagy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 20, 1-12.

Corona G., Deiana M., Incani A., Vauzour D., Dessi M.A., Spencer J.P.E. (2007). Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362(3), 606-611.

- Corrales M., Toepfl S., Butz P., Knorr D., Tauscher B. (2008).** Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: a comparison. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(1), 85-91.
- Corrales M., García A.F., Butz P., Tauscher B. (2009).** Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering*, 90 (4), 415-421.
- Cosme F., Ricardo-Da-Silva J.M., Laureano O. (2009).** Tannin profiles of *Vitis vinifera L.* cv. red grapes growing in Lisbon and from their monovarietal wines. *Food Chemistry*, 112(1), 197-204.
- Cozma, A., Andrei S., Miere D., Filip I., Loghin F. (2011).** Proteins Profile in Milk from Three Species of Ruminants. *Notulae Scientia Biologicae*, 3(1), 26–29.
- Cunha S.C., Fernandes J. (2018).** Extraction techniques with deep eutectic solvents. *Trends in Analytical Chemistry*, 105, 225-239.
- D’Agostino M.A. (2018).** Enthesitis detection by ultrasound: where are we now? *Clinical and Experimental Rheumatology*, 36(114) 127-130.
- Da Porto C., Porretto E., Decorti D. (2013).** Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera L.*) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(4), 1076-1080.
- Da Silva A.P.G. (2021).** Fighting coronaviruses with natural polyphenols. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 37, 102179-102186.
- Da Silva A.S.A., Inoue H., Endo T., Yano S., P.S. Bon E. (2010).** Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresource Technology*, 101(19), 7402-7409.
- Dai Y., Van Spronsen J., Witkamp G.J., Verpoorte R., Hae Choi Y. (2013).** Ionic liquids and deep eutectic solvents in natural products research: Mixtures of solids as extraction solvents. *Journal of Natural Products*, 76, 2162-2173.
- Dai Y., Verpoorte R., Hae Choi Y. (2014).** Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*). *Food Chemistry*, 159, 116-121.
- Dai Y., Witkamp G.J., Verpoorte R., Hae Choi Y. (2015).** Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chemistry*, 187, 14-19.
- Dai Y., Rozema E., Verpoorte R., Hae Choi Y. (2016).** Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents. *Journal of Chromatography A*, 1434, 50-56.

De La Puerta R., Ruiz Gutierrez V., Hoult J.R.S. (1999). Inhibition of Leukocyte 5-Lipoxygenase by Phenolics from Virgin Olive Oil. *Biochemical Pharmacology Journal*, 57(4), 445–449.

De La Torre-Carbot K., Chavez-servin J.L., Jauregui O., Castellote A.I., Lamuela-Raventos R.M., Fito M., Covas M.I., Munoz-Aguayo D., Lopez-Sabater M.C., (2007). Presence of virgin olive oil phenolic metabolites in human low density lipoprotein fraction: Determination by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chemistery Acta.*, 583(2), 402-410.

De Wit J. N. (1989). Fonctionnal properties of whey proteins ; in «Developments in Dairy Chemistry». Elsevier Science, New-York.

Decker E.A., Ivanov V., Zhu B.Z., Frei B. (2001). Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by carnosine histidine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 511-516.

Dedousi M., Mamoudaki V., Grigorakis S., Makris D.P. (2017). Ultrasound-assisted extraction of polyphenolic antioxidants from olive (*Olea europaea*) leaves using a novel glycerol/sodium-potassium tartrate low-transition temperature mixture (LTTM). *Environments*, 4, 31-41.

Del Rio J.A., Baidez A.G., Botia J.M., Ortuno A. (2003). Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea* L.) and their influence on resistance against *Phytophthora* sp. *Food Chemistry*, 83(1), 75-78.

Della Ragione F., Cucciolla V., Borriello A., Della pietra V., Pontoni G., Racioppi L., Manna C., Galletti P., Zappia V. (2000). Hydroxytyrosol, a Natural Molecule Occurring in Olive Oil, Induces Cytochrome C-Dependent Apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 278(3), 733-739.

Demers-Mathieu V., Gauthier S. F., Britten M., Fliss I., Robitaille G., Jean J. (2013). Antibacterial activity of peptides extracted from tryptic hydrolyzate of whey protein by nanofiltration. *International Dairy Journal*, 28, 94-101.

Dermeche S., Nadour M., Larroche C., Moulti-Mati F., Michaud P. (2013). Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, 48(10), 1532-1552.

Dias R., Oliveira H., Fernandes I., Simal-Gandara J., Perez-Gregorio R. (2021). Recent advances in extracting phenolis compounds from food and their use in disease prevention and cosmetics. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 61, 1130-1151.

Dicko M.H., Gruppen H., Traoré A.S., Voragen A.G.J., van Berkel W.J.H. (2006). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of sorghum for food use. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 1(1), 21-38.

Do Q.D., Angkawijaya A.E., Tran-Nguyen P.L., Huynh L.H., Soetaredjo F.E., Ismadji S., Ju Y.-H. (2013). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoids content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatic*. *Journal Food Drug Analysis*, 22, 296-302.

- Domon B. (2006).** Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science*, 312(5771), 212-217.
- Donsí F., Ferrari G., Fruilo M., Pataro G. (2011).** Pulsed electric fields-assisted vinification. *Procedia Food Science*, 1, 780-785.
- Doula M.K. (2017).** Olive mill waste: recent advances for the sustainable development of olive oil industry; in «Olive Mill Waste». Elsevier, Academic Press, 1^{ère} éd., London.
- Durham R.J. (2007).** Waste management and co-product recovery in dairy processing; in : «Handbook of Waste Management and Co-Product Recovery in Food Processing». Elsevier, Cambridge.
- Durham R. J. (2000).** Development of a process for the purification of lactose from whey, PhD thesis, University of Western Sydney, Hawkesbury, Australia.
- Dykes L., Rooney L.L., Waniska R.D., Rooney W.L. (2005).** Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Sorghum Grains of Varying Genotypes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 6813-6818.
- Egito A.S., Girardet J.M., Miclo L., Gaillard J.L. (2001).** Highly sensitive periodic acid/Schiff detection of bovine milk glycoproteins electrotransferred after nondenaturing electrophoresis, and isoelectric focusing. *Lait*, 81, 775-785.
- Eigel W.N., Butler J.E., Ernstrom C.A., Farrell Jr. H.M., Harwalkar V.R., Jenness R., Whitney R. M. (1984).** Nomenclature of Proteins of Cow's Milk: Fifth Revision. *Journal of Dairy Research*, 67, 8, 1599-1631.
- El Darra N., Grimi N., Vorobiev E., Louka N., Maroun R. (2013).** Extraction of polyphenols from red grape pomace assisted by pulsed ohmic heating. *Food and Bioprocess Technology*, 6(5), 1281-1289.
- ElAgamy E.L. (2006).** Camel milk production and utilization ; in «Handbook of milk of non-bovine mammals». Blackwell Publishing, 1^{ère} éd., Iowa, USA.
- Elagamy E.L., Ruppanner R., Ismail A., Champagne C.P., Assaf R. (1996).** Purification and characterization of lactoferrin, lactoperoxidase, lysozyme and immunoglobulins from camel's milk. *International Dairy Journal*, 6(2), 129–145.
- El-Hatmi H., Jrad Z., Salhi I., Aguib A., Nadri A., Khorchani T. (2015).** Comparison of composition and whey protein fractions of human, camel, donkey, goat and cow milk. *Mljekarstvo*, 65,159–67.
- Erdman K., Cheung B.W.Y., Schröder, H. (2008).** The possible role of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19, 643–654.
- Eriksson M., Strid I., Hansson P.A. (2015).** Carbon footprint of food waste management options in the waste hierarchy-a Swedish case study. *Journal Cleaner Production*, 93, 115-125.

Eskin N.A.M. (2013). Milk ; in «Biochemistry of Foods». Academic Press, Inc, 2ème éd., New York.

Evans E.W. (1982). Uses of milk proteins in formulated foods; in «Developments in Food Proteins». Applied Science Publishers, London.

Fabiani R., De Bartolomeo A., Rosignoli P., Servili M., Selvaggini R., Montedoro G.F., Di saverio C., Morozzi G. (2006). Virgin Olive Oil Phenols Inhibit Proliferation of Human Promyelocytic Leukemia Cells (HL60) by Inducing Apoptosis and Differentiation. *Journal of Nutrition*, 136(3), 614-619.

Fanali C., Della Posta S., Dugo L., Gentili A., Mondello L., De Gara L. (2020). Choline-chloride and betaine-based deep eutectic solvents for green extraction of nutraceutical compounds from spent coffee ground. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 189(10), 113421-113445.

Farah Z. (1986). Effect of heat treatment on whey proteins of camel milk. *Milchwissenschaft*, 41(12), 763-765.

Fang Y.Z., Yang S., Wu G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18, 872-879.

Farrell H.M., Jimenez-Flores R., Bleck G.T., Brown E.M., Butler J.E., Creamer L.K., Hicks C.L., Hollar C.M., Ng-Kwai-Hang N.K., Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk - Sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87, 1641-1674.

Fasasi K.A. (2012). Physicochemical attributes of Nigerian natural honey from honeybees (*Apis mellifera adansonii*) (*Hymenoptera: Apidae*) and its shelf life in storage at room temperature. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 15(21), 1027-1033.

Fito M., Covas M.I., Lamuela-Raventos R.M., Vila J., Torrents J., De La Torre C., Marrugat J. (2000). Protective Effect of Olive Oil and Its Phenolic Compounds Against Low Density Lipoprotein Oxidation. *Lipids*, 35 (6), 633-638.

Fito M., Cladellas M., De La Torre R., Marti J., Alcantara M., Pujadas-Bastardes M., Marrugat J., Bruguera J., Lopez-Sabater M.C., Vila J., Covas M.I. (2005). Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis*, 181(1), 149-158.

FitzGerald R., Meisel H. (2003). Milk protein hydrolysates and bioactive peptides ; in «Advanced dairy chemistry». Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1^{ère} éd., New York.

FitzGerald R. J., Murray B. A., Walsh D. J. (2004). Hypotensive peptides from milk proteins. *Journal of Nutrition*, 134, 980S-988S.

Fki I., Bouaziz M., Sahnoun Z., Sayadi S. (2005). Hypocholesterolemic effects of phenolic-rich extracts of Chemlali olive cultivar in rats fed a cholesterol-rich diet. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13(18), 5362-5370.

Fleming, H.P., W.M. Walter, J.R., Etchells, J.L. (1973). Antimicrobial Properties of Oleuropein and Products of Its Hydrolysis from Green Olives. *Applied Microbiology*, 26(5), 777-782.

Fontana A.R., Antonioli A., Bottini R.N. (2013). Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(38), 8987-9003.

Fox P.F., Uniacke-Lowe T., McSweeney P.L.H., O'Mahony J.A. (2015). Milk Proteins ; in «*Dairy Chemistry and Biochemistry*». Springer, 2ème éd., Switzerland.

Francisco M., van den Bruinhorst A., Kroon M.C. (2013). Low-transition-temperature mixtures (LTTMs): A new generation of designer solvents. *Angewandte Chemie International Edition*, 52, 3074-3085.

Franco M.N., Galeano-Díaz T., López Ó., Fernández-Bolaños J.G. Sánchez J., De Miguel, C., Gil M.V., Martín-Vertedor D. (2014). Phenolic compounds and antioxidant capacity of virgin olive oil. *Food Chemistry*, 163, 289-298.

Franzoi M., Niero G., Visentin G., Penasa M., Cassandro M., De Marchi M. (2019). Variation of Detailed Protein Composition of Cow Milk Predicted from a Large Database of Mid-Infrared Spectra. *Animals*, 9(4), 176-190.

Fritsch R.J., Krause I. (2003). Electrophoresis; in «*Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*». Academic Press, 2ème éd., San Diego.

Frutos P., Hervás G., Giráldez F. J., Mantecón A. R. (2004). Review. Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2 (2), 191-202.

Furneri P.M., Marino A., Saija A., Uccella N., Bisignano G. (2002). In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *International Journal Antimicrobial Agents*, 20(4), 293-296.

Galanakis C.M., Tsatalas P., Galanakis I.M. (2018). Implementation of phenols recovered from olive mill wastewater as UV booster in cosmetics. *Industrial Crops and Products*, 111, 30-37.

Galvez-Perez A., Martín-Lara M.A., Calero M., Perez A., Canu P., Blazquez G. (2021). Experimental investigation on the air gasification of olive cake at low temperatures. *Fuel Processing Technology*, 213, 106703-106715.

Gambini J., Inglés M., Olaso G., Lopez-Grueso R., Bonet-Costa V., Gimeno-Mallench L., Mas-Bargues C., Abdelaziz K. M., Gomez-Cabrera M.C., Vina J., Borrás C. (2015). In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, (doi : 10.1155/2015/837042).

Gammoh S., Alu'datt M.H., Tranchant C.C., Al-U'datt D.G., Alhamad M.N., Rababah T., Kubow S., Haddadin M.S.Y., Ammari Z., Maghaydah S., Banat H. (2020). Modification of the functional and bioactive properties of camel milk casein and whey

proteins by ultrasonication and fermentation with *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technology*, 129, (doi : 10.1016/j.lwt.2020.109501).

García A., Rodríguez-Juan E., Rodríguez-Gutiérrez G., Rios J.J., Fernández-Bolaños J. (2016). Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESs). *Food Chemistry*, 197, 554-561.

Garg L.K., Reddy V.S., Sait S.S., Krishnamurthy T., Vali S.J., Reddy A.M. (2013). Quality by Design: Design of Experiments Approach Prior to the Validation of a Stability-Indicating HPLC Method for Montelukast. *Chromatographia*, 76, 1697-1706.

Gautheron M., Lepouze A. (2012). Le lait, un aliment indispensable. Grand Pierre C, Ghisolfi J, Thomsent TH (1988). Etude biochimique du lait de chèvre. Edition CCAN. *Nutrition DIET*, 23, 364-374.

Geerts B.F., van Dongen M.G. J., Flaming B., Moerland M.M., de Kam M.L., Cohen A.F., A Romijn J., C Gerhardt C., Kloek J., Burggraaf J. (2011). Hydrolyzed casein decreases postprandial glucose concentrations in T2DM patients irrespective of leucine content. *Journal of Dietary Supplements*, 8, 280-292.

Ghafoor K., Choi Y.H., Jeon J.Y., Jo I.H. (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4988-4994.

Gill H.S., Doull F., Rutherford K.J., Cross M.L. (2000). Immunoregulatory peptides in bovine milk. *British Journal of Nutrition*, 84, S111-S117.

Gironi F., Piemonte V. (2011). Temperature and solvent effects on polyphenol extraction process from chestnut tree wood. *Chemical Engineering Research Design*, 89, 857-862.

Girotti-Chanu C. (2006). Study of lipolysis and synthesis of dermis compounds under the effect of cirsimarine, flavone extracted from *Microtea Debilis*. Doctoral thesis in Biochemistry. National Institute of Applied Sciences of Lyon. France.

Glass G.V., Peckham P.D., Sanders J.R. (2012). Consequences of failure to meet assumptions underlying the fixed effects analyses of variance and covariance. *Educational Research Review*, 42, 237-228.

Gogoi S.B., Kakoty M. (2017). A study of CO₂ flooding on wave velocities in the Naharkatiya oil reservoir of Upper Assam Basin. *Resource-Efficient Technologies*, 3(1), 101-112.

Gómez-Caravaca A.M., Gómez-Romero M., Arráez-Román D., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(4), 1220-1234.

Gonzalez-Santiago M., Martin-Bautista E., Carrero J.J., Fonolla J., Baro L., Bartolome M.V., Gil-Loyzaga P., Lopez-Huertas E. (2006). One-month administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidant present in olive oil, to hyperlipemic rabbits improves blood lipid profile, antioxidant status and reduces atherosclerosis development. *Atherosclerosis*, 188(1), 35-42.

- Goulas V., Exarchou V., Troganis A.N., Psomiadou E., Fotsis T., Briasoulis E., Gerothanassis I.P. (2009).** Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, 600-608.
- Goupy J. (2006).** Les plans d'expériences. *Revue Moulrad*, 34, 74-116.
- Griggs M.A. (1921).** The Alkaline Hydrolysis of Casein. *Journal of Industrial & Engineering Chemistry*, 13(11), 1027-1028.
- Gullon B., Pintado M.E., Fernández-López J., Pérez-Álvarez J.A., Viuda-Martos M. (2015).** In vitro gastrointestinal digestion of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-products: Changes in the antioxidant potential and bioactive compounds stability. *Journal of Functional Foods*, 19, 617-628.
- Guo M. (2003).** Goat milk ; in «Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition». Academic Press Inc, 2^{ème} éd., San Diego.
- Gutierrez M.A.C., Ferrer M.A.L., Mateo C.R., del Monte F. (2009).** Freeze-drying of aqueous solutions of deep eutectic solvents: a suitable approach to deep eutectic suspensions of self-assembled structures. *Langmuir*, 25(10), 5509-5515.
- Haenlein G.F.W. (2004).** Goat milk in human nutrition. *Small Ruminants Research*, 51,155-63.
- Hamdi H.K., Castellon R. (2005).** Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an antitumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334(3), 769-778.
- Hartmann R., Meisel, H. (2007).** Food-derived peptides with biological activity: From research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 1-7.
- Hayes M., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Stanton C. (2007).** Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part I: Overview. *Biotechnology Journal*, 2,426-434.
- He Z. (2017a).** Bio-based Wood Adhesives: Preparation, Characterization, and Testing. *Journal of Materials Science Research*, 6 (3), 20-26.
- Hernández-Ledesma B., Beatriz M., Lourdes A., Mercedes R., Isidra R. (2005).** Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 85, 1041-1048.
- Hernández-Ledesma B., Dávalos A., Bartolomé B., Amigo L. (2005a).** Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin. Identification of Active Peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 588-593.
- Hernández-Ledesma B., Miralles B., Amigo L., Ramos M., Recio I. (2005b).** Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(6), 1041-1048.

Hillier R.M. (1976). The quantitative measurement of whey proteins using polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Dairy Science*, 43, 259-265.

Ho C.H., Cacace J.E., Mazza G. (2008). Mass transfer during pressurized low polarity water extraction of lignans from flaxseed meal. *Journal Food Engineering*, 89, 64-71.

Huang Y.S., Redden P., Lin X., Smith R., Mackinnon S., Horrobin D.F. (1991). Effect of dietary olive oil non-glyceride fraction on plasma cholesterol level and liver phospholipid fatty acid composition. *Nutrition Research*, 11(5), 439-448.

Hui-Chun W., Hua-Ming C., Chyuan-Yuan S. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36, 949-957.

Hurley W.L., Theil P.K. (2013). Immunoglobulins in Mammary Secretions ; in «Advanced Dairy Chemistry». Springer, 4^{ème} éd., New York.

Ishak N.A.M., Ahmad S. (2016). Estimating Optimal Parameter of Box-Cox Transformation in Multiple Regression with Non-normal Data ; in: «Regional Conference on Science Technology and Social Sciences (RCSTSS 2016)». Springer, 1^{ère} éd., Singapore.

Ismail I. (2017). Alpha-lactalbumin gene polymorphisms in relation to milk protein concentration in maghrabi camel. *Egyptian Journal of Desert Research*, 67(1), 127-137.

Ismaili A., Saidi M., Zahar B., Hamama M., Ezzaier Raghia A. (2016). Composition and microbial quality of raw camel milk produced in Morocco. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 81(1), 17-21.

Jacquot A., Gauthier S., Drouin R., & Boutin Y. (2010). Proliferative effect of synthetic peptides from β -lactoglobulin and α -lactoalbumin on murine splenocytes. *International Dairy Journal*, 20, 514-521.

Jancheva M., Grigorakis S., Loupassaki S., Makris D.P. (2017). Optimised extraction of antioxidant polyphenols from *Satureja thymbra* using newly designed glycerol-based natural low-transition temperature mixtures (LTTMs). *Journal of Applied Research and Medical Aromatic Plants*, 6, 31-40.

Japón-Luján R., Luque-Rodríguez J.M., Luque De Castro M.D. (2006). Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal Chromatography A*, 1108, 76-82.

Jauhainen T., Korpela R. (2007). Milk peptides and blood pressure. *Journal of Nutrition*, 137, 825S-829S.

Jeong K.M., Zhao J., Jin Y., Heo S.R., Han S.Y., Yoo D.E., Lee J. (2015). Highly efficient extraction of anthocyanins from grape skin using deep eutectic solvents as green and tunable media. *Archives of Pharmacal Research*, 38(12), 2143-2152.

Jenkins T.C., McGuire M.A. (2006). Major Advances in Nutrition: Impact on Milk Composition. *Journal of Dairy Science*, 89(4), 1302–1310.

Jiju A. (2014). Full Factorial Designs ; in «Design of Experiments for Engineers and Scientists». Elsevier, 2ème éd., Scotland.

Jin H., Liu C. Zhang S., Guo Z., Li J., Zhao Q., Zhang Y., Xu J. (2020). Comparison of protein hydrolysates against their native counterparts in terms of structural and antioxidant properties, and when used as emulsifiers for curcumin nanoemulsions. *Food & Function*, **11**, 10205-10218.

Joseph Davidson M., Balasubramanian K., Tagore G.R.N. (2008). Surface roughness prediction of flow-formed AA6061 alloy by design of experiments. *Journal of Material Processing Technology*, 202, 41-46.

Justino C.I.L., Pereira R., Freitas, A.C., Rocha-Santos T.A.P., Panteleitchouk T.S.L., Duarte A.C. (2012). Olive oil mill wastewaters before and after treatment: a critical review from the ecotoxicological point of view, *Ecotoxicology*, 21(2), 615–629.

Kanyshkova T.G., Buneva V.N., Nevinsky G.A. (2001). Lactoferrin and its biological functions. *Biochemistry Moscow*, 66, 1-7.

Kappeler, P. M. (1998). Nests, tree holes, and the evolution of primate life histories. *American Journal of Primatology*, 46(1), 7–33.

Karakashov B., Grigorakis S., Loupassaki S., Makris D.P. (2015). Optimisation of polyphenol extraction from *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) using aqueous glycerol and response surface methodology. *Journal of Applied Research and Medical Aromatic Plants*, 2, 1-8.

Karković Marković A., Torić J., Barbarić M., JokobušićBrala C. (2019). Hydroxytyrosol, Tyrosol, Derivatives, and Their Potential Effects on Human Health. *Molecules*, 24, 2001–2039.

Katsampa P., Valsamedou E., Grigorakis S., Makris D. (2015). A green ultrasound-assisted extraction process for the recovery of antioxidant polyphenols and pigments from onion solid wastes using Box–Behnken experimental design and kinetics. *Industrial Crops and Products*, 77, 535-543.

Kelebek H., Selli S., Kola O. (2016). Quantitative determination of phenolic compounds using LC-DAD-ESI-MS/MS in cv. Ayvalik olive oils as affected by harvest time. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11, 226-235.

Kennedy B.K., Berger S.L., Brunet A., Campisi J., Cuervo A.M., Epel E.S., Franceschi C., Lithgow G.J., Morimoto R.I., Pessin J.E., Rando T.A., Richardson A., Schadt E.E., Wyss-Coray T., Sierra F. (2014). Geroscience: linking aging to chronic disease. *Cell*, 159(4), 709-713.

Khalili A., Nekoeian A. A., Khosravi, M.B. (2017). Oleuropein improves glucose tolerance and lipid profile in rats with simultaneous renovascular hypertension and type 2 diabetes. *Journal of Asian Natural Products Research*, 19(10), 1011-1021.

- Khan M.d.Y., Panchal S., Vyas N., Butani A., Kumar V. (2007).** *Olea europaea*: A Phyto-Pharmacological Review. *Pharmacognosy Review*, 1(1), 114-118.
- Khanbabaee K., Van Ree T. (2001).** Tannins: Classification and Definition. *Natural Product Reports*, 18 (6), 641-649.
- Khueychai S., Jangpromma N., Choowongkomon K., Joompang A., Daduang S., Vesaratchavest M., Payoungkiattikun W., Tachibana S., Klaynongsruang S. (2018).** A novel ACE inhibitory peptide derived from alkaline hydrolysis of ostrich (*Struthio camelus*) egg white ovalbumin. *Process Biochemistry*, 37, 235-245.
- Killara A., Vaghela M.N. (2004).** Whey proteins ; in: «Proteins in food processing». CRC press, 2^{ème} éd., Woodhead Publishing, Cambridge.
- Kim I., Lee J. (2017).** Comparison of different extraction solvents and sonication times for characterization of antioxidant activity and polyphenol composition in mulberry (*Morus alba* L.). *Applied Biological Chemistry*, 60, 509-517.
- Kim S.B., Seo S., Khan M. A., Ki K.S., Nam M.S., Kim S.H. (2007).** Separation of iron-binding protein from whey through enzymatic hydrolysis. *International Dairy Journal*, 17, 625-631.
- Kim S.W., Hur W., Li T.Z., Lee Y.K., Choi J.E., Hong S.W., Lyoo K.S., You C.R., Jung E.S., Jung C.K., Park T., Um S.J., Yoon S. K. (2014).** Oleuropein prevents the progression of steatohepatitis to hepatic fibrosis induced by a high-fat diet in mice. *Experimental & Molecular Medicine*, 46, 103-92.
- Kim S.S., Kwak H.S., Kim M.J. (2020).** The effect of various salinity levels on metabolomic profiles, antioxidant capacities and sensory attributes of doenjang, a fermented soybean paste. *Food Chemistry*, 328, (doi : 10.1016/j.foodchem.2020.127176).
- Kitts D.D., Weiler K. (2003).** Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1309-1323.
- Konte M. (1999).** Le lait et les produits laitiers. Développement de systèmes de productions intensives en Afrique de l'ouest. Université de Nouakchott (R.I.M) Faculté des Sciences et Technologies des aliments, B. P. 5026. ISRA/ URV – LNERV/FEVRIER : 2-25
- Korhonen H. (1995).** Whey as raw material for development of new products for human nutrition and health : a review. Proceedings of the NJF/NMR-Seminar No. 252. Turku, Finland, 13-15.1.1995. NJF-Repport 102, p. 207-219.
- Korhonen H., & Pihlanto A. (2003).** Food-derived bioactive peptides – Opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1297-1308.
- Korhonen H., & Pihlanto A. (2007b).** Technological options for the production of health-promoting proteins and peptides derived from milk and colostrum. *Current Pharmaceutical Design*, 13, 829-843.

- Korhonen M., Vanhatalo A., Huhtanen P. (2002).** Effect of Protein Source on Amino Acid Supply, Milk Production, and Metabolism of Plasma Nutrients in Dairy Cows Fed Grass Silage. *Journal of Dairy Science*, 85(12), 3336-3351.
- Kottaras P., Koulianos M., Makris D.P. (2017).** Low-transition temperature mixtures (LTTMs) made of bioorganic molecules: Enhanced extraction of antioxidant phenolics from industrial cereal solid wastes. *Recycling*, 2, 3-13.
- Kumari B., Tiwari B.K., Hossain M.B., Brunton N.P., Rai D.K. (2017).** Recent Advances on Application of Ultrasound and Pulsed Electric Field Technologies in the Extraction of Bioactives from Agro-Industrial By-products. *Food and Bioprocess Technology*, 11(2), 223-241.
- Lacroix I.M.E., Li-Chan E.C.Y. (2014a).** Overview of food products and dietary constituents with antidiabetic properties and their putative mechanisms of action: A natural approach to complement pharmacotherapy in the management of diabetes. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58, 61-78.
- Lacroix I.M., Li-Chan E.C. (2014b).** Isolation and characterization of peptides with dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity from pepsin-treated bovine whey proteins. *Peptides*, 54, 39-48.
- Laemmli U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lafka T.I., Lazou A., Sinanoglou V., Lazos E. (2013).** Phenolic Extracts from Wild Olive Leaves and Their Potential as Edible Oils Antioxidants. *Foods*, 2(1), 18-31.
- Lasekan O., Ng S., Azeez S., Shittu R., Teoh L., Gholivand S. (2016).** Effect of Pulsed Electric Field Processing on Flavor and Color of Liquid Foods. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(3), 1745-4549.
- Lebersorger S., Schneider F. (2011).** Discussion on the methodology for determining food waste in household waste composition studies. *Journal of Waste Management*, 31, 1924-1933.
- Lee O.H., Lee B.Y., Lee J., Lee H.B., Son J.Y., Park C.S., Shetty K., Kim Y.C. (2009).** Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bioresources and Technologies*, 100, 6107-6113.
- Lee-Huang S., Zhang L.P.L., Chang Y.T., Huang P.L. (2003).** Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1infection and OLE treatment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307(4), 1029-1037.
- Lee-Huang S., Huang P.L., Zhang D., Lee J.W., Bao J., Sun Y., Chang Y.T., Zhang J., Huang P.L. (2007).** Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part II. Integrase inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(4), 879-884.
- León-Espinosa E., Calderón-Domínguez G., García-Garibay M., Díaz-Ramírez M., Cruz-Monterrosa R., Ruiz-Hernández R., Pérez-Ruiz R., & Jiménez-Guzmán J. (2021).** Evaluation of the antioxidant activity from bovine serum albumin protein fractions. *Agro Productividad*, 4, (doi: 10.32854/agrop. v14i9.2149).

- Lepore S.M., Morittu V.M, Celano M., Trimboli F., Oliverio M., Procopio A., Di Loreto C., Damante G., Britti D., Bulotta S., Russo D. (2015).** Oral Administration of Oleuropein and Its Semisynthetic Peracetylated Derivative Prevents Hepatic Steatosis, Hyperinsulinemia, and Weight Gain in Mice Fed with High Fat Cafeteria Diet. *International Journal of Endocrinology*, 11(8), 1829-1830.
- Li Y., Skouroumounis G.K., Elsey G.M., Taylor D.K. (2011).** Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols. *Food Chemistry*, 129(2), 570- 576.
- Liakopoulos G., Karabourniotis G. (2005).** Boron deficiency, concentrations, and composition of phenolic compounds in *Olea europaea* leaves: A combined growth chamber and field study. *Tree Physiology*, 25, 307-315.
- Linos A., Kaklamani V.G., Kaklamani E., Koumantaki Y. Giziaki E., Papazoglou S., Mantzoro C.S. (1999).** Dietary factors in relation to rheumatoid arthritis: a role for olive oil and cooked vegetables? *American Journal of Clinical Nutrition*, 70(6), 1077-1082.
- Liu H.C., Chen W.L., Mao S.J.T (2007).** Antioxidant Nature of Bovine Milk β -Lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 90(2), 547-555.
- Liu J.G., Wang Q.H., Ma H.Z., Wang S. (2010).** Effect of pretreatment methods on L-lactic acid production from vinasse fermentation ; in : «Advanced Materials Research, vol. 113–116». Trans Tech Publications Ltd., Switzerland.
- Lopez S., Pacheco Y.M., Bermudez B., Abia R., Muriana F.J.G. (2004).** Olive oil and cancer. *Grasas Aceites*, 55(1), 33-41.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951).** Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biochemistry*, 193, 265-275.
- Luzi F., Pannucci E., Santi L., Kenny J.M., Torre L., Bernini R., Puglia D. (2019).** Gallic Acid and Quercetin as Intelligent and Active Ingredients in Poly(vinyl alcohol) Films for Food Packaging. *Polymers*, 11(12), 1999-2019.
- Maes W., van Camp J., Vermeirssen V., Hemeryck M., Ketelslegers J.M., Schrezenmeier J., Schrezenmeier J., Van Oostveldt P., Huyghebaert A. (2004).** Influence of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (ALPMHIR) on the release of endothelin-1 by endothelial cells. *Regulatory Peptides*, 118, 105-109.
- Maiuri M.C., De Stefano D., Di Meglio P., Irace C., Savarese M., Sacchi R., Cinelli M.P., Carnuccio, R. (2005).** Hydroxytyrosol, a phenolic compound from virgin olive oil, prevents macrophage activation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacology*, 371(6), 457-465.
- Malaeb Z.A. (1997).** A SAS code to correct for non-normality and non-constant variance in regression and anova models using the Box–Cox method of power transformation. *Environmental Monitoring and Assessment*, 47, 255-273.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747.

- Manna C., Migliardi V., Golino P., Scognamiglio A., Galletti P., Chiariello M., Zappia V. (2004).** Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, 15(8), 461-466.
- Marnila P., Korhonen H. (2011).** Colostrum ; in «Encyclopedia of Dairy Sciences». Academic Press Inc, 2^{ème} éd., San Diego.
- Marrugat J., Covas M.I., Fito M., Schröder H., Miro-Casas E., Gimeno E., Lopez-Sabater M.C., De La Torre, R., Farré, M. (2004).** Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation. *European Journal of Nutrition*, 43(3), 140-147.
- Marshall K. (2004).** Therapeutic applications of whey protein. *Alternative Medicine Review*, 9, 136156.
- Martínez-Maqueda D., Miralles B., De Pascual-Teresa S., Reverón I., Muñoz R., Recio I. (2012).** Food-derived peptides stimulate mucin secretion and gene expression in intestinal cells. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 60, 8600-88605.
- Martínez-Maqueda D., Miralles B., Ramos M., Recio I. (2013).** Effect of β -lactoglobulin hydrolysate and β -lactorphan on intestinal mucin secretion and gene expression in human goblet cells. *Food Research International*, 54, 1287-1291.
- Matar C., LeBlanc J. G., Martin L., Perdígón G. (2003).** Biologically active peptides released ; in «Handbook of Fermented Functional Foods». CRC Press, Taylor and Francis, Florida.
- Mati A., Girardet J.M., Xenakis D. Linden G. (1991).** Isolement et caractérisation de la fraction Protéose-peptone des laits bovin, ovin et caprin. *Lait*, 71, 259-273.
- Mati A., Senoussi-Ghezali C., Si Ahmed Zennia S., Almi-Sebbane D., El-Hatmi H., Girardet J.M. (2016).** Dromedary camel milk proteins, a source of peptides having biological activities – A review. *International Dairy Journal*, 73, 25-37.
- Maubois J.L., Léonil J. (1989).** Peptides du lait à activité biologique. *Dairy Science and Technology*, 89(4), 245-269.
- McMahon D.J., Brown R.J. (1984).** Composition, Structure, and Integrity of Casein Micelles: A Review. *Journal of Dairy Science*, 67(3), 499-512.
- McSweeney P.L.H., O'Mahony J.A. (2016).** Advanced Dairy Chemistry. Springer, 4^{ème} éd., New York.
- Meeran S.M., Akhtar S., Katiyar S.K. (2009).** Inhibition of UVB-induced skin tumor development by drinking green tea polyphenols is mediated through DNA repair and subsequent inhibition of inflammation. *Journal Investigative Dermatology*, 129, 1258-1270.
- Menendez J.A., Vazquez-Martin A., Colomer R., Brunet J., Carrasco-Pancorbo A., Garcia-Villalba R., Fernandez-Gutierrez A., Segura-Carretero A. (2007).** Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin™) in HER2-overexpressing breast cancer cells. *BMC Cancer*, 7(1), 1-19.

Merin U., Bernstein S., Bloch-Damti A., Yagil R., Creveld C., Lindner P., Gollop N. (2000). A comparative study of milk serum proteins in camel milk (*Camelus dromedarius*) and bovine colostrum. *Livestock Production Science*, 67(3), 297-301.

Merone G.M., Tartaglia A., Rosato E., D'Ovidio C., Kabir A., Ulusoy H.I., Savini F., Locatelli M. (2021). Ionic Liquids in Analytical Chemistry: Applications and Recent Trends. *Current Analytical Chemistry*, 17, 1340-1355.

Micol V., Caturla N., Perez-Fons L., Mas V., Perez L., Estepa A. (2005). The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV). *Antiviral Research*, 66(2-3), 129-136.

Miles E.A., Zoubouli P., Calder P.C. (2005). Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition*, 21(3), 389-394.

Mirabella N., Castellani V., Sala S. (2014). Current options for the valorization of food manufacturing waste: A review. *Journal of Cleaner Production*, 65, 28-41.

Mizuno S., Matsuura K., Gotou T., Nishimura S., Kajimoto O., Yabune M., Yoshitaka K., Yamamoto, N. (2005). Antihypertensive effect of casein hydrolysate in a placebo controlled study in subjects with high normal blood pressure and mild hypertension. *British Journal of Nutrition*, 94, 84-91.

Mizushima S., Ohshige K., Watanabe J., Kimura M., Kadowaki T., Nakamura Y., Tochikubo O., Ueshima H. (2004). Randomized controlled trial of sour milk on blood pressure in borderline hypertensive men. *American Journal of Hypertension*, 17, 701-706.

Mollica A., Zengin G., Stefanuccia A., Ferrantea C., Menghinia L., Orlando G., Brunettia L., Locatellia M., Dimmitoa M.P., Novellinoc E. (2018). Nutraceutical potential of *Corylus avellana* daily supplements for obesity and related dysmetabolism. *Journal of Functional Foods*, 47, 562-574.

Morais, H.A., Silvestre M.P.C., Silveira, J.N., Silva A.C.S., Silva V.D., Medeiros S., Mauro R. (2013). Action of a pancreatin and an *Aspergillus oryzae* protease on whey proteins: correlation among the methods of analysis of the enzymatic hydrolysates. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(6), 985-995.

Moreno J.J. (2003). Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages raw 264.7. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(9), 1073-1081.

Morifuji M., Ishizaka M., Baba S., Fukuda K., Matsumoto H., Koga J., Kanegae M., Higuchi M. (2010). Comparison of different sources and degrees of hydrolysis of dietary protein: Effect on plasma amino acids, dipeptides, and insulin responses in human subjects. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 58, 8788-8797.

Mullally M.M., O'Callaghan D.M., FitzGerald R.J. (1994) Proteolytic and peptidolytic activities in commercial pancreatic protease preparations and their relationship to some whey protein hydrolysate characteristics. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42, 2973-2981

Mullally M., Meisel M., FitzGerald R.J. (1997). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *International Dairy Journal*, 7, 299-303.

Mulvihill D.M., Ennis M.P. (2003). Functional milk proteins: Production and utilization ; in : «Advanced Dairy Chemistry». Springer, 3^{ème} éd., New-York.

Murray B.A., FitzGerald R.J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: Biochemistry, bioactivity and production. *Current Pharmaceutical Design*, 13, 773-791.

Mutilangi W.A.M., Panyam D., Kilara A. (1995). Hydrolysates from proteolysis of heat denaturated whey proteins. *Journal of Food Science*, 60, 1104-1109.

Naczk M., Shahidi F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 95–111.

Naik L., Mann B., Bajaj R., Sangwan R., Sharma R. (2013). Process optimization for the production of bio-functional whey protein hydrolysates: Adopting response surface methodology. *International Journal of Peptide Research & Therapeutics*, 19, 231-237.

Naziri E., Glisic S.B., Mantzouridou F.T., Tsimidou M.Z., Nedovic V., Bugarski B. (2016). Advantages of supercritical fluid extraction for recovery of squalene from wine lees. *The Journal of Supercritical Fluids*, 107, 560-565.

Nefzaoui A., (1985). Valorisation des résidus lignocellulosiques dans l'alimentation des ruminants par les traitements aux alcalis. Application aux grignons d'olive. Ph.D. Thesis. Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium.

Ng-Kwai-Hang K.F., Hayes J.F., Moxley J.E., Monardes H.G. (1982). Environmental Influences on Protein Content and Composition of Bovine Milk. *Journal of Dairy Science*, 65(10), 1993–1998.

Niki E., Yoshida Y., Saito Y., Noguchi N. (2005). Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338, 668-676.

Nnanna I.A., Wu C. (2007). Dairy protein hydrolysates ; in «Handbook of Food Products Manufacturing». John Wiley & Sons Inc., 2^{ème} volume, New Jersey.

Nongonierma A.B., Mazzocchi C., Paoletta S., FitzGerald R.J. (2017). Release of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from milk protein isolate (MPI) during enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 94, 79-89.

Nunes M.A., Pimentel F., Costa A.S.G., Alves R.C., Oliveira M.B.P.P. (2016). Olive by-products for functional and food applications: Challenging opportunities to face environmental constraints. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 35, 139-148.

- Nunes A., Costa, A.S.G., Bessada S., Santos J., Puga H., Alves R.C., Freitas V.O, M.B.P.P. (2018).** Olive pomace as a valuable source of bioactive compounds: A study regarding its lipid- and water-soluble components. *Science of The Total Environment*, 644, 229–236.
- Nurminen M. L., Sipola M., Kaarto, H., Pihlanto-Leppälä A., Piilola K., Korpela R., Tossavainen O., Korhonen H., Vapaatalo H. (2000).** α -Lactorphin lowers blood pressure via radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*, 66, 1535-1543.
- O'dowd Y., Driss F., Dang P.M.C., Elbim C., Gougerot-pocidallo M.A., Pasquier C., El-Benna, J. (2004).** Antioxidant effect of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil: scavenging of hydrogen peroxide but not superoxide anion produced by human neutrophils. *Biochemical Pharmacology Journal*, 68(10), 2003-2008.
- O'Kennedy, B.T. (2011).** Caseins ; in « Handbook of Food Proteins». Woodhead Publishing, 1^{ère} éd., New York.
- O'Mahony J.A., Fox P.F. (2013).** Milk proteins: introduction and Historical Aspects ; in «Advanced Dairy Chemistry». Springer, 4^{ème} éd., Springer, New York.
- O'Mahony J.A., Fox P.F., Kelly A.L. (2013).** Indigenous Enzymes of Milk ; in «Advanced Dairy Chemistry». Springer, 4^{ème} éd., Boston.
- Ochirkhuyag B., Chobert J. M., Dalgalarondo M., Choiset Y., Haertle T. (1998).** Characterization of whey proteins from Mangolian yak, khainak and bactrian camel. *Journal of Food Biochemistry*, 22, 105-124.
- Omar S.H. (2010a).** Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. *Pharmaceutical Science*, 78 (2), 133-154.
- Omar S.H. (2010b).** Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18(3), 111-121.
- Onumaegbu C., Mooney J., Alaswad A., Olabi A.G. (2018).** Pre-treatment methods for production of biofuel from microalgae biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 93, 16–26.
- Ortega-García F., Peragón J. (2010).** Phenol Metabolism in the Leaves of the Olive Tree (*Olea europaea* L.) cv. *Picual*, *Verdial*, *Arbequina*, and *Frantoio* during Ripening. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58, 12440-12448.
- Oseguera-Toledo M., González de Mejía E., Reynoso-Camacho R., Cardador-Martínez A., Amaya-Liano, S. (2014).** Proteins and bioactive peptides. *Nutrafoods*, 13, 147-157.
- Otte, J., Ju, Z.Y., Fregemand, M., Lomholt, S.B., Qvist, K.B. (1996a).** Protease-induced aggregation and gelation of whey proteins. *Journal of Food Science*, 61, 911-915.
- Owen R.W., Mier W., Giacosa A., Hull W.E., Spiegelhalder B., Bartsch H. (2000).** Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total

phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chemistry and Toxicology*, 38(8), 647-659.

Özcan M.M., Matthäus B. A. (2016). Review: Benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *European Food Research and Technology*, 243, 89-99.

Ozrenk E., Inci S.S. (2008). The effect of seasonal variation on the composition of cow milk in van province. *Pakistan Journal of Nutrition*, 7(1), 161-164.

Ozuna C., Paniagua-Martínez I., Castaño-Tostado E., Ozimek L., Amaya-Llano Silvia L. (2015). Innovative applications of high-intensity ultrasound in the development of functional food ingredients: Production of protein hydrolysates and bioactive peptides. *Food Research International*, 77(4), 685-696.

Özyürek M., Bektaşoğlu B., Güçlü K., Güngör N., Apak R. (2008). Simultaneous total antioxidant capacity assay of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the same acetone–water solution containing 2% methyl- β -cyclodextrin using the cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method. *Analytica Chimica Acta*, 630(1), 28-39.

Özyürek M., Güçlü K., Tütem E., Başkan K.S., Erçağ E., S. Esin Ç., Baki S., Yıldız L., Karaman Ş., Apak R. (2011). A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical Methods*, 3(11), 2439–2454.

Pais Chanfrau J.M., Núñez Pérez J., Lara Fiallos M.V., Rivera Intriago L.M., Abril Porras V.H., Cuaran Guerrero M.J., Trujillo Toledo L.E. (2017). Milk Whey- From a Problematic Byproduct to a Source of Valuable Products. *The Prensa Medica Argentina*, 103(4), 1-11.

Paiva A., Craveiro R., Aroso I., Martins M., Reis R.L., Duarte A.R.C. (2014). Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 2, 1063-1071.

Panasiuk R., Amarowicz R., Kostyra H., Sijtsma L. (1998). Determination of α -amino nitrogen in pea protein hydrolysates: a comparison of three analytical methods. *Food Chemistry*, 62(3), 363-367.

Papargyropoulou E., Lozano R., Steinberger J.K., Wright N., Ujang Z.B. (2014). The food waste hierarchy as a framework for the management of food surplus and food waste. *Journal of Cleaner Production*, 76, 106-115.

Pedreschi F., Travisany X., Reyes C., Troncoso E., Pedreschi E. (2009). Kinetics of extraction of reducing sugar during blanching of potato slices. *Journal of Food Engineering*, 91, 443-447.

Pellegrini A., Thomas U., Bramaz N., Hunziker P., von Fellenberg R. (1999). Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine α -lactalbumin molecule. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1426, 439-448.

- Pellegrini A., Dettling C., Thomas U., Hunziker P. (2001).** Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β -lactoglobulin. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1526, 131-140.
- Pellegrino L., Masotti F., Cattanea S., Hogenboom J.A., de Noni I. (2013).** Nutritional Quality of Milk Proteins ; in «Advanced Dairy Chemistry». Springer, 4^{ème} éd., Boston.
- Pena-Pereira F., Namieśnik J. (2014).** Ionic Liquids and Deep Eutectic Mixtures: Sustainable Solvents for Extraction Processes. *Sustainable Chemistry Journal*, 7(7), 1784-1800.
- Peña-Ramos E.A., Xiong Y.L. (2001).** Antioxidative Activity of Whey Protein Hydrolysates in a Liposomal System. *International Dairy Journal*, 84(12), 2577-2583.
- Peña-Ramos E.A., Xiong Y.L. (2002).** Antioxidant Activity of Soy Protein Hydrolysates in a Liposomal System. *Food Chemistry and Toxicology*, 67(8), 2952-2956.
- Peng X., L. Xiong Y., Kong B. (2009).** Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. *Food Chemistry*, 113(1), 196-201.
- Pérez-Trujillo M., Gómez-Caravaca A.M., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., Parella T. (2010).** Separation and Identification of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil from *Olea europaea* L. by HPLC-DAD-SPE-NMR/MS. Identification of a New Diastereoisomer of the Aldehydic Form of Oleuropein Aglycone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(16), 9129-9136.
- Perona J.S., Cabello-Moruno R., Ruiz-Gutierrez V. (2006).** The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *Journal Nutrition Biochemistry*, 17, 429-445.
- Perpetuo E.A., Juliano L., Lebrun I. (2003).** Biochemical and pharmacological aspects of two bradykinin-potentiating peptides from tryptic hydrolysis of casein. *Journal of Protein Chemistry*, 22, 601-606.
- Pihlanto A. (2006).** Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16(11), 1306-1314.
- Pihlanto-Leppälä A., Koskinen P., Piilola K., Tupasela T., Korhonen H. (2000).** Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research*, 67(1), 53-64.
- Poudyal H., Campbell F., Brown L. (2010).** Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate, high fatfed rats. *Journal of Nutrition*, 140(5), 946-953.
- Pouliot Y., Gauthier S.F., Groleau P.E. (2006).** Membrane-based fractionation and purification strategies for bioactive peptides ; in «Nutraceutical proteins and peptides in health and disease nutraceutical science and technology». Taylor and Francis, 1^{ère} éd., London.
- Power O., Fernández A., Norris R., Riera F.A., FitzGerald R.J. (2014).** Selective enrichment of bioactive properties during ultrafiltration of a tryptic digest of β -lactoglobulin. *Journal of Functional Foods*, 9, 38-47.

- Puel C., Quintin A., Agalias A., Mathey J., Obled C., Mazur A., Davicco M.J., Lebecque P., Skaltsounis A. L., Coxam V. (2004).** Olive oil and its main phenolic micronutrient (oleuropein) prevent inflammation-induced bone loss in the ovariectomised rat. *British Journal of Nutrition*, 92(1), 119-127.
- Qian Z.J., Jung W.K., Kim S.K. (2008).** Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysates of bullfrog skin *Rana Catesbeiana* Shaw. *Bioresource Technology*, 99, 1690-1698.
- Quideau S., Deffieux D., Douat-Casassus C., Pouységu L. (2011).** Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(3), 586–621.
- Quiles J.L., Farquharson A.J., Simpson D.K., Grant I., Wahle K.W.J. (2002).** Olive oil phenolics: effects on DNA oxidation and redox enzyme mRNA in prostate cells. *British Journal of Nutrition*, 88(3), 225-234.
- Quirantes-Piné R., Zurek G., Barraón-Catalán E., Bäßmann C., Micol V., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. (2013).** A metabolite-profiling approach to assess the uptake and metabolism of phenolic compounds from olive leaves in SKBR3 cells by HPLC–ESI-QTOF-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analytical*, 72, 121-126.
- Radošević K., Ćurko N., Srček V.G., Bubalo M.C., Tomašević M., Ganić K.K., Redovniković I.R. (2016).** Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. *LWT-Food Science and Technology*, 73, 45-51.
- Rahli F., Saidi N., Kihal M. (2013).** Evaluation of the factors affecting the variation of the physicochemical composition of Algerian Camel's raw milk during different seasons. *Advanced Environmental Biology*, 7(14), 4879-4884.
- Rahmanian N., Jafari S.M., Wani T.A. (2015).** A comprehensive review on the bioactive profile, dehydration, Extraction and application of the bioactive components of olive leaves. *Trends Food Science and Technology*, 42(2), 150-172.
- Rajha H.N., Boussetta N., Louka N., Maroun R.G., Vorobiev E. (2014).** A comparative study of physical pretreatments for the extraction of polyphenols and proteins from vine shoots. *Food Research International*, 65, 462-468.
- Rakotondramasy-Rabesiaka L., Havet J.L., Porte C., Fauduet H. (2010).** Estimation of effective diffusion and transfer rate during the protopine extraction process from *Fumaria officinalis* L. *Sep. Purification Technologies*, 76, 126-131.
- Ramić M., Vidović S., Zeković Z., Vladić J., Cvejin A., Pavlić A. (2014).** Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from *Aronia melanocarpa* by-products from filter-tea factory. *Ultrasonic Sonochemistry*, 23, 360-368.
- Reddy I.M., Mahoney A.W. (1995).** Solution visible difference spectral properties of Fe³⁺-L-amino acid complexes at pH 6.60. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 43, 1436-1443.

Reddy I.M., Kella N.K.D., Kinsella J.E. (1988). Structural and conformational basis of the resistance of .beta.-lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(4), 737-741.

Rektor A., Vatai G. (2004). Membrane filtration of Mozzarella whey, *Desalination Journal*, 162, 279-286.

Rente D., Paiva A., Duarte A.R. (2021). The Role of Hydrogen Bond Donor on the Extraction of Phenolic Compounds from Natural Matrices Using Deep Eutectic Systems. *Molecules*, 26, 2336-2368.

Ricciutelli M., Marconi S., Boarelli M.C., Caprioli G., Sagratini G., Ballini R., Fiorini D. (2017). Olive oil polyphenols: A quantitative method by high-performance liquid-chromatography-diode-array detection for their determination and the assessment of the related health claim. *Journal of Chromatography A*, 1481, 53-63.

Richards N.S.P.S. (2002). Soro Lácteo – Perpectivas Industriais e Proteção ao Meio Ambiente, *Food Ingredients*, 17, 20-27.

Richter B.E., Jones B.A., Ezzell J.L., Porter N.L. (1996). Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Analytical Chemistry*, 68(6), 1033-1039.

Rodrigues F., Pimentel F.B., Oliveira M.B.P.P. (2015). Olive by-products: Challenge application in cosmetic industry. *Industrial Crops and Products*, 70, 116–124.

Romero-Díez R., Matos M., Rodrigues L., Bronze M.R., Rodríguez-Rojo S., Cocero M., Matias A.A. (2019). Microwave and ultrasound pretreatments to enhance anthocyanins extraction from different wine lees. *Food Chemistry*, 272, 258-266.

Roncada P., Piras C., Soggiu A., Turk R., Urbani A., Bonizzi L. (2012). Farm animal milk proteomics. *Journal of Proteomics*, 75(14), 4259-4274.

Roupe K.A., Yáñez J.A., Teng X.W., Davies N.M. (2006). Pharmacokinetics of selected stilbenes: rhapontigenin, piceatannol and pinosylvin in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(11), 1443-1450.

ROUSSOS S., PERRAUD-GAIME I., Lakhar H., Aouidi F., Labrousse Y., Belkacem N., MACARIE H., Artaud J. (2009). Valorisation biotechnologique des sous- produits de l'olivier par fermentation en milieu solide ; in « Pour un secteur oléicole rénové, rentable et compétitif en Méditerranée Sfax, Tun». Séminaire Olivebioteq, 2009/12/15-19, ISBN 978-9938-9513-0-1.

Rovery M. (1956). Sur l'activation du chymotrypsinogène par la trypsine. *Bulletin de Société Chimique Biologique*, 10(38), (9-10).

Roy D., Ye A., Moughan P.J., Singh H. (2020). Composition, Structure, and Digestive Dynamics of Milk From Different Species—A Review. *Frontiers in Nutrition*, 7, 195-212.

Ruano, J. Lopez-miranda J., Fuentes F., Moreno J.A., Bellido C., Perez-Martínez P., Lozano A., Gómez P., Jiménez Y., Pérez Jiménez F. (2005). Phenolic Content of Virgin Olive Oil Improves Ischemic Reactive Hyperemia in Hypercholesterolemic Patients. *Journals of the American College of Cardiology*, 46(10), 1864-1868.

Rubio-Senent F., Rodríguez-Gutiérrez G., Lama-Muñoz A., Fernández-Bolaños J. (2012). New Phenolic Compounds Hydrothermally Extracted from the Olive Oil Byproduct Alperujo and Their Antioxidative Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(5), 1175-1186.

Rubio-Senent F., Lama-Muñoz A., Rodríguez-Gutiérrez G., Fernández-Bolaños J. (2013). Isolation and Identification of Phenolic Glucosides from Thermally Treated Olive Oil Byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(6), 1235-1248.

Rutherford S.M. (2010). Methodology for Determining Degree of Hydrolysis of Proteins in Hydrolysates: A Review. *Journal of AOAC International*, 93(5), 1515–1522.

Ryan D., Antolovich M., Prenzler P., Robards K., Lavee S. (2002). Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea*. *Scientia Horticulture-Amsterdam*, 92(2), 147-176.

Sadat L., Cakir-Kiefer C., N'Negue M.A., Gaillard J. L., Girardet J.M., Miclo L. (2011). Isolation and identification of antioxidant peptides from bovine α -lactalbumin. *International Dairy Journal*, 21, 214-221.

Şahin S., Bilgin M. (2017). Olive tree (*Olea europaea* L.) leaf as a waste by-product of table olive and olive oil industry: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(4), 1271-1279.

Saito, T. (2008). Antihypertensive peptides derived from bovine casein and whey proteins ; In «Advances in experimental medicine and biology: Bioactive components of milk». Springer, New York.

Saito K., Jin D.H., Ogawa T., Muramoto K., Hatakeyama E., Yasuhara T. (2003). Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 51, 3668-3674.

Salami M., Galli C., De Angelis L., Visioli F. (1995). Formation of f,-isoprostanes in oxidized low-density lipoprotein: inhibitory effect of hydroxytyrosol. *Pharmacology Research*, 31(5), 275-279.

Salami M., Moosavi-Movahedi A.A., Ehsani M.R., Yousefi R., Haertlé T., Chobert J-M., Razavi S.H., Henrich R., Balalaie S., Ebadi S.A., Pourtakdoost S.N-N., Niasari-Naslaji A. (2010). Improvement of the Antimicrobial and Antioxidant Activities of Camel and Bovine Whey Proteins by Limited Proteolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), 3297-3302.

Savijoki K., Ingmer H., Varmanen, P. (2006). Proteolytic Systems of Lactic Acid Bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 394-406.

Saxena S., Caroni P. (2011). Selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases: From stressor thresholds to degeneration. *Neuron*, 71, 35-48.

Schlimme E., Meisel H. (1993). Bioactive peptides: Structural, physiological and analytical aspects. *Newsletter of the IDF*, 139, 57-89.

Seppo L., Kerojoki O., Suomalainen T., Korpela R. (2002). The effect of a *Lactobacillus helveticus* LBK-16 H fermented milk on hypertension - A pilot study on humans. *Milchwissenschaft*, 57, 124-127.

Seppo L., Jauhiainen T., Poussa T., Korpela R. (2003). A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 326-330.

Servili M., Selvaggini R., Esposto S., Taticchi A., Montedoro G.F., Morozzi G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography. A*, 1054 (1-2), 113-127.

Sessa M., Casazza A.A., Perego P., Tsao R., Ferrari G., Donsí F. (2013). Exploitation of polyphenolic extracts from grape marc as natural antioxidants by encapsulation in lipid-based nanodelivery systems. *Food and Bioprocess Technology*, 6 (10), 2609-2620.

Shishov A., Bulatov A., Locatelli M., Carradori S., Andruch V. (2017). Application of deep eutectic solvents in analytical chemistry. *Microchemistry Journal*, 135, 33-38.

Si Ahmed Z.S., Almi D., Senoussi C., Boudjenah H.S., Mati A. (2013). Separation and characterization of major milk proteins from Algerian Dromedary (*Camelus dromedarius*). *Emirates Journal of Food Agriculture*, 25(4), 283-290.

Si H., Liu D. (2014). Dietary antiaging phytochemicals and mechanisms associated with prolonged survival. *Journal of Nutrition Biochemistry*, 25, 581-591.

Sichien M. (2009). Processing means for milk fat fractionation and production of functional compounds ; in « Dairy-Derived Ingredients ». CRC Press, 1ère éd., Woodhead Publishing, New York.

Sierra J., Martí E., Garau M.A., Cruañas R. (2007). Effects of the agronomic use of olive oil mill wastewater: Field experiment. *Science of the Total Environment*, 378, 90-94.

Silva M.R., Rodrigues D.F., Lana F.C., Silva V.D.M., Morais H.A., Silvestre M.P.C. (2010). Perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos do concentrado proteico do soro de leite, obtidos pela ação da pancreatina e da papaína. *Nutrire*, 35, 97 – 114.

Sindhi V., Gupta V., Sharma K., Bhatnagar S., Kumari R., Dhaka N. (2013). Potential applications of antioxidants. *Journal of Pharmaceutical Research*, 7, 828-835.

Singh I., Mok M., Christensen A.M., Turner A.H., Hawley J.A. (2007). The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function. *Nutrition Metabolic Cardiovascular Disease*, 18(2), 127-132.

Singh R., Mal G., Kumar D., Patil N.V., Pathak K.M.L. (2017). Camel Milk: An Important Natural Adjuvant. *Agricultural Research*, 6(4), 327-340.

Sipola M., Finckenberg P., Korpela R., Vapaatalo H., Nurminen M.L. (2002). Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. *Journal of Dairy Research*, 69, 103-111.

Slim Z., Jancheva M., Grigorakis S., Makris D.P. (2018). Polyphenol extraction from *Origanum dictamnus* using low-transition temperature mixtures composed of glycerol and organic salts: Effect of organic anion carbon chain length. *Chemical Engineering and Communications*, 205, 1494-1506.

Smith R.M. (1984). Standardisation in reversed-phase HPLC. *Trends in Analytical Chemistry*, 3(7), 186-190.

Smithers G.W. (2008). Whey and whey proteins-From 'gutter-to-gold'. *International Dairy Journal*, 18(7), 695-704.

Smyth M., Fitzgerald R.J. (1998). Relationship between some characteristics of WPC hydrolysates and the enzyme complement in commercially available protease preparations. *International Dairy Journal*, 8, 819-827.

Soler-Rivas C., Garcia-Rosado A., Polonia I., Junca-Blanch G., Marin F.R., Wichers H.J. (2006). Microbiological effects of olive mill waste addition to substrates for *Pleurotus pulmonarius* cultivation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 57(1), 37-44.

Spellman D., McEvoy E., O'Cuinn G., FitzGerald R.J. (2003). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 13(6), 447-453.

Storcksdieck S., Bonsmann G., Hurrell R. (2007). Iron-binding properties, amino acid composition, and structure of muscle tissue peptides from in vitro digestion of different meat sources. *Journal of Food Science*, 72, S019-S029.

Swaisgood H.E. (1982). Chemistry of milk protein; in: « Development in Dairy Chemistry». Ed. Applied Science Publishers, London.

Swaisgood, H.E. (1992). Chemistry of the caseins; in «Advanced Dairy Chemistry». Elsevier Applied Science, 2^{ème} éd., London.7

Takaki K., Hatayama H., Koide S., Kawamura Y. (2011). Improvement of polyphenol extraction from grape skin by pulse electric field ; in: «Pulsed Power Conference (PPC)». 2011 *IEEE Pulsed Power Conference*, 1262-1265, Chicago, USA.

Takano, T. (2002). Anti-hypertensive activity of fermented dairy products containing biogenic peptides. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 333-340.

Talhaoui N., Gómez-Caravaca A.M., Roldán C., León L., De la Rosa R., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero A. (2015). Chemometric Analysis for the Evaluation of Phenolic Patterns in Olive Leaves from Six Cultivars at Different Growth Stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(6), 1722-1729.

Talhaoui, N., Gómez-Caravaca A.M., León L., De la Rosa R., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A. (2014). Determination of phenolic compounds of 'Sikitita' olive leaves by HPLC-DAD-TOF-MS. Comparison with its parents 'Arbequina' and 'Picual' olive leaves. *LWT - Food Science and Technology*, 58(1), 28-34.

Talhaoui N., Taamalli A., Gómez-Caravaca A.M., Fernández-Gutiérrez A., Segura-Carretero A. (2015). Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *International Journal of Food Research*, 77, 92-108.

Talhaoui N., Vezza T., Gómez-Caravaca A.M., Fernández-Gutiérrez A., Gálvez J., Segura-Carretero A. (2016). Phenolic compounds and in vitro immunomodulatory properties of three Andalusian olive leaf extracts. *Journal of Functional Foods*, 22, 270-277.

Tapia-Quirós P. Montenegro-Landívar M.F., Reig M., Vecino X., Saurina J., Granados M., Cortina J.L. (2022). Integration of membrane processes for the recovery and separation of polyphenols from winery and olive mill wastes using green solvent-based processing. *Journal of Environmental Management*, 307, 114555-114567.

Tari N.R, Fan M.Z., Archbold T., Kristo E., Guri A., Arranz E., Corredig M. (2018). Effect of milk protein composition of a model infant formula on the physicochemical properties of in vivo gastric digestates. *Journal of Dairy Science*, 101(4), 2851–2861.

Tatke P., Rajan M., (2014). Comparison of conventional and novel extraction techniques for the extraction of scopoletin from *Convolvulus Pluricaulis*. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 48(1), 27-31.

Tercan S., Seker M. (2012). Comparison of polyphenol extractions from olive pomace and solid fraction of olive mill wastewater. *Natural Product Research*, 26(19), 1837-1841.

Teschemacher H., Koch G., Brantl V. (1997). Milk protein derived opioid receptor ligands. *Peptide Science*, 43, 99-117.

Théolier J., Hammami R., Labelle P., Fliss I., Jean J. (2013). Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 706–714.

Topel A. (2004). *Chemie und Physik der Milch: Naturstoff, Lebensmittel.* Behrs Verlag, 4^{ème} éd., Hamburg.

Trichopoulou, A. Katsouyanni K., Stuver S., Tzala L., Gnardellis C., Rimm E., Trichopoulos, D. (1995). Consumption of Olive Oil and Specific Food Groups in Relation to Breast Cancer Risk in Greece. *Journal National Cancer Institute*, 87(2), 110-116.

- Tripoli E., Giammanco M., Tabacchi G., Di Majo D., Giammanco S., La guardia M. (2005).** The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Review*, 18(1), 98–112.
- Tsabouri S., Douros K., Priftis N.P. (2014).** Cow's Milk Allergenicity. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 14(1), 16-26
- Tsai A.C., Liou M., Simak M., Cheng P.E. (2017).** On hyperbolic transformations to normality. *Computational Statistics and Data Analysis*, 115, 250-266.
- Tsimidou M., Papadopoulos G., Boskou D. (1992).** Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by reversed-phase HPLC with emphasis on UV detection. *Food Chemistry*, 44 (1), 53-60.
- Tsioulpas A., Lewis M.J., Grandison A.S. (2007).** A study of the pH of individual milk samples. *International Journal of Dairy Technology*, 60(2), 96-97.
- Tylewicz U. (2018).** Target sources of polyphenols in different food products and their processing by-products ; in « Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications ». Elsevier Woodhead Publishing, Duxford.
- Van der Ven C., Gruppen H., de Bont D.B.A., Voragen A.G.J. (2001).** Emulsion properties of casein and whey protein hydrolysates and the relation with other hydrolysate characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (10), 5005-5012.
- Veith P.D., Reynolds E.C. (2004).** Production of a High Gel Strength Whey Protein Concentrate from Cheese Whey. *Journal of Dairy Science*, 87(4), 831-840.
- Vergara-Salinas J.R., Pérez-Jiménez J., Torres J.L., Agosin E., Pérez-Correa, J.R. (2012).** Effects of Temperature and Time on Polyphenolic Content and Antioxidant Activity in the Pressurized Hot Water Extraction of Deodorized Thyme (*Thymus vulgaris*). *Journal Agricultural Food Chemistry*, 60, 10920-10929.
- Vetal M.D., Lade V.G., Rathod V.K. (2013).** Extraction of ursolic acid from *Ocimum sanctum* by ultrasound: Process intensification and kinetic studies. *Chemical Engineering and Processing Process. Intensification*, 69, 24-30.
- Vinha A.F., Ferreres F., Silva B.M., Valentão P., Gonçalves A., Pereira J.A., Oliveira M.B., Seabra R.M., Andrade P.B. (2005).** Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry*, 89, 561-568.
- Visioli F., Bellosta S., Galli C. (1998).** Oleuropein, the bitter principle of olives, enhances nitric oxide production by mouse macrophages. *Life Science*, 62(6), 541-546.
- Visioli F., Caruso D., Galli C., Viappiani S., Galli G., Sala A. (2000a).** Olive Oils Rich in Natural Catecholic Phenols Decrease Isoprostane Excretion in Humans. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 278(3), 797-799.
- Visioli F., Galli C., Plasmati E., Viappiani S., Hernandez A., Colombo C., Sala A. (2000b).** Olive Phenol Hydroxytyrosol Prevents Passive Smoking-Induced Oxidative Stress. *Circulation*, 102, 2169-2171.

- Wali, A., Ma H., Shahnawaz M., Hayat, K., Xiaong J., Jing L. (2017).** Impact of Power Ultrasound on Antihypertensive Activity, Functional Properties, and Thermal Stability of Rapeseed Protein Hydrolysates. *Journal of Chemistry*, 3, 1-11.
- Walstra P., Jenness R. (1984).** Dairy chemistry & physics. John Wiley & Sons, New York,
- Wang J.C., Bennett M. (2012).** Aging and atherosclerosis: Mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. *Circulation Research*, 111, 245-259.
- Wang W., Mejia E.G.D. (2005).** A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety*, 4, 63-78.
- Wang L., Weller C.L. (2006).** Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312.
- Wang P.F., Huang G.R., Jiang J.X. (2013).** Optimization of hydrolysis conditions for the production of iron-binding peptides from mackerel processing by-products. *Advance Journal of Food Science & Technology*, 5, 921-925.
- Wangoh J., Farah Z., Puhan Z. (1998).** Composition of milk from three camel (*Camelus dromedarius*) breeds in Kenya during lactation. *Milchwissenschaft*, 53 (3), 136-139.
- Waterman E., Lockwood B. (2007).** Active Components and Clinical Applications of Olive Oil. *Alternative Medicine Review*, 12 (4), 331-342.
- Whitaker J.R. (1994).** Principles of enzymology for the food sciences. Marcel Dekker, 2^{ème} éd., New York.
- Winkelhausen E., Pospiech R., Laufenberg G. (2005).** Antifungal activity of phenolic compounds extracted from dried olive pomace. *Bulletin of Chemists and Technologists of Macedonia*, 24(1), 41-46.
- Wiseman S.A., Tijburg L.B.M., van de Put F.H.M.M. (2002).** Olive Oil Phenolics Protect LDL and Spare Vitamin E in the Hamster. *Lipids*, 37, 1053-1057.
- Wu H.C., Chen H.M., Shiau C.Y. (2003).** Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36, 949–957.
- Xia B., Yan D., Bai Y. Xie J., Cao Y., Liao D., Lin L. (2015).** Determination of phenolic acids in *Prunella vulgaris L.* a safe and green extraction method using alcohol-based deep eutectic solvents. *Analytical Methods*, 7, 9354-9364.
- Xie D.Y., Dixon R.A. (2005).** Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers?. *Phytochemistry*, 66(18), 2127-2144.

- Yamamoto N., Akino A., Takano T. (1994).** Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, 77, 917-922.
- Yamine S., Brianceau S., Manteau S., Turk M., Ghidossi R., Vorobiev E., Mietton-Peuchot M. (2018).** Extraction and purification of high added value compounds from by-products of the winemaking chain using alternative/nonconventional processes/technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58 (8), 1375-1390.
- Ye A., Singh H. (2006).** Adsorption behaviour of lactoferrin in oil-in-water emulsions as influenced by interactions with β -lactoglobulin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 295(1), 249–254.
- Yetilmezsoya K., Demirel S., Vanderbei R.J. (2009).** Response surface modeling of Pb (II) removal from aqueous solution by *Pistacia vera* L.: Box–Behnken experimental design. *Journal Hazardous Material*, 171, 551-562.
- Yorgun M.S., Balcioglu I.A., Saygin O. (2008).** Performance comparison of ultrafiltration, nanofiltration and reverse osmosis on whey treatment. *Desalination Journal*, 229, 204-216.
- Yuan J.J., Wang C.Z., Ye Z., Tao R., Zhang Y.S. (2015).** Enzymatic Hydrolysis of Oleuropein from *Olea europea* (Olive) Leaf Extract and Antioxidant Activities. *Molecules*, 20, 2903-2921.
- Zhang Q.X., Wu H., Ling Y.F., Lu R.R. (2013).** Isolation and identification of antioxidant peptides derived from whey protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and Q-TOF MS. *Journal of Dairy Research*, 80, 367-373.
- Zhao L., Huang S., Cai X., Hong J., Wang S. (2014).** A specific peptide with calcium chelating capacity isolated from whey protein hydrolyzate. *Journal of Functional Foods*, 10, 46-53.
- Zhao L., Cai X., Huang S., Wang S., Huang Y., Hong J., Rao P. (2015).** Isolation and identification of a whey protein-sourced calcium-binding tripeptide Tyr-Asp-Thr. *International Dairy Journal*, 40, 16-23.
- Zhou L., M. Budge S., Ghaly A.E., S. Brooks M., Dave D. (2011).** Extraction, Purification and Characterization of Fish Chymotrypsin: A Review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 7(3), 104-123.
- Zhou J., Wang X., Ai T., Cheng X., Guo H.Y., Teng G.X., Mao X.Y. (2012).** Preparation and characterization of β -lactoglobulin hydrolysate-iron complexes. *Journal of Dairy Science*, 95, 4230-4236.
- Zobiri-Illoul A., Yabrir B., Laoun A., Mati A. (2020).** Electrophoretic behavior of ewe milk proteins from local breeds Rembi and Ouled-Djellal of the Algerian central steppe. *Acta Agronomica*, 69(1), 14-19.

***PUBLICATIONS ET
COMMUNICATIONS***

Ce présent travail a fait l'objet de publications et communications suivantes :

Publications internationales

1. Extraction of Polyphenols from Olive Leaves Employing Deep Eutectic Solvents: The Application of Chemometrics to a Quantitative Study on Antioxidant Compounds.
H. Akli, S. Grigorakis, A. Kellil, S. Loupassaki, D.P. Makris, A. Calokerinos, A. Mati, and N. Lydakis-Simantiris.
2022, Applied Sciences, 12, 831-848.
2. *In vitro* Enzymatic Hydrolysis of Bovine Whey proteins with Chymotrypsin, Trypsin and Pepsin using a Full Factorial and a Surface Response Methodology.
H. Akli, S. Grigorakis, L. Canabady-Rochelle, S. Loupassaki, D.P. Makris, N. Lydakis-Simantiris, A. Mati. En préparation.

Communications internationales

1. Low-Transition Temperature Mixtures Based on Amino Acids: Synthesis and Extraction Efficiency of Phenolics from Olive Mill by-Products.
Lydakis-Simantiris, N. **Akli**, H. Grigorakis, S. Loupassaki, S. Mati, A. Makris, D.
The 1st International Congress on Analytical and Bioanalytical Chemistry (1st ICABC)
Turkey, March 2019.
2. An Optimized Enzymatic Hydrolysis of Bovine Whey Protein with Chymotrypsin, Trypsin, and Pepsin Using a Full Factorial and a Surface Response Methodology.
H. Akli, S. Grigorakis, S. Loupassaki, I. Livieratos, D. Makris, N. Lydakis-Simantiris, A. Mati.
The 12th NIZO Dairy Conference.
The Netherlands, October 2021.
3. An Optimized Enzymatic Hydrolysis of Bovine Whey Protein with Chymotrypsin, Trypsin, and Pepsin Using a Full Factorial and a Surface Response Methodology.
H. Akli, S. Grigorakis, S. Loupassaki, I. Livieratos, D. Makris, N. Lydakis-Simantiris, A. Mati.
The 5th International Conference on Agricultural and Food Science.
Turkey, October 2021.
4. Extraction of Polyphenols from Olive Leaves Employing Deep Eutectic Solvents: The Application of Chemometrics to a Quantitative Study on Antioxidant Compounds.
H. Akli, S. Grigorakis, A. Kellil, S. Loupassaki, D.P. Makris, A. Calokerinos, A. Mati, and N. Lydakis-Simantiris.
The 4th International Conference on Chemistry and Pharmaceutical Chemistry, Scientific Meditech.
The United Kingdom, March 2022.

5. Green solvents for polyphenol extraction from olive by-products (leaves, pomace, olive mill wastewater): A comparison study based on an optimized polyphenol extraction using a Box Behnken design.

H. Akli, S. Grigorakis, A. Kellil, S. Loupassaki, D.P. Makris, A. Calokerinos, A. Mati, N. Lydakis-Simantiris.

The 5th International Conference on Chemistry and Pharmaceutical Chemistry,
Scientific Meditech.

The United Kindom, July 2022

Article

Extraction of Polyphenols from Olive Leaves Employing Deep Eutectic Solvents: The Application of Chemometrics to a Quantitative Study on Antioxidant Compounds

Hamida Akli ^{1,2}, Spyros Grigorakis ¹, Abdessamie Kellil ¹ , Sofia Loupassaki ¹, Dimitris P. Makris ³ ,
Antony Calokerinos ⁴ , Abderrahmane Mati ² and Nikos Lydakis-Simantiris ^{5,6,*} 

- ¹ Food Quality & Chemistry of Natural Products, Mediterranean Agronomic Institute of Chania, International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies, P.O. Box 85, 73100 Chania, Greece; hakli.aklih@gmail.com (H.A.); grigorakis@maich.gr (S.G.); kellilabdessamie@gmail.com (A.K.); sofia@maich.gr (S.L.)
- ² Analytical Biochemistry and Biotechnologies Research Laboratory (LABAB), Mouloud Mammeri University, Tizi Ouzou 15000, Algeria; mati_bio@yahoo.com
- ³ Green Processes & Biorefinery Group, School of Agricultural Sciences, University of Thessaly, N. Temponera Street, 43100 Karditsa, Greece; dimitrismakris@uth.gr
- ⁴ Department of Chemistry, National and Kapodistrian University of Athens, 15772 Athens, Greece; calokerinos@chem.uoa.gr
- ⁵ Hellenic Mediterranean University Research Center, Institute of Agri-Food and Life Sciences, 71410 Heraklion, Greece
- ⁶ Department of Agriculture, Hellenic Mediterranean University, 71410 Heraklion, Greece
- * Correspondence: lydakis@hmu.gr



Citation: Akli, H.; Grigorakis, S.; Kellil, A.; Loupassaki, S.; Makris, D.P.; Calokerinos, A.; Mati, A.; Lydakis-Simantiris, N. Extraction of Polyphenols from Olive Leaves Employing Deep Eutectic Solvents: The Application of Chemometrics to a Quantitative Study on Antioxidant Compounds. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 831. <https://doi.org/10.3390/app12020831>

Academic Editor:
Alessandra Durazzo

Received: 1 October 2021

Accepted: 15 December 2021

Published: 14 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The extraction of phenolic compounds from olive leaves was optimized using three glycerol-based deep eutectic solvents (DESs) with lysine, proline, and arginine. A three-level Box–Behnken design was used to examine the influence of the liquid/solid ratio, concentration of DESs, and extraction temperature on the yield of the extraction process. A second-order polynomial model was used for predicting the polyphenol extraction yield. The optimal predicted conditions were used for extractions and they provided the highest total phenol yields with the glycerol–lysine exhibiting the best performance. Quantification of tyrosol, hydroxytyrosol, oleuropein, luteolin-7-O-glucoside, and rutin in the extracts showed high content in tyrosol in all DESs, particularly with glycerol–lysine and relatively similar contents with other studies for the other phenolic compounds. Finally, a linear relationship between tyrosol content and the total phenolic content of the extracts was observed.

Keywords: deep eutectic solvents; extraction; polyphenols; olive leaves

1. Introduction

Food industries generate considerable quantities of wastes or by-products during food processing [1]. Nowadays, one of the major concerns for the food industry is the proper management of waste [2]. An appropriate waste management strategy should necessarily consider sustainable development [3]. The suggested waste hierarchies firstly prioritize the prevention of waste production and secondly the management of waste by reusing, recycling, or recovering processes [4]. Numerous investigations have used recovery technologies as a management strategy due to the high potential of food industry by-products in pharmaceuticals, cosmetics, and food production [5,6]. In recent years, there is, on the one hand, a high demand worldwide for natural ingredients instead of chemical substances, and on the other hand, a growing interest to limit food industry waste in order to protect the ecosystem. This double interest encourages, furthermore, the management of valuable components contained in different sources of food waste.

Olive leaves (OLLs) are the by-product of the olive oil industry. A large amount of OLLs is engendered every year by pruning [7]. OLLs abound with bioactive natural

products such as phenolic compounds, which exhibit a broad spectrum of bioactivities, including antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, antihypertensive, hypoglycemic, cardioprotective activities, etc. [8]. A beneficial effect on oxidative stress-based diseases has been observed with the intake of polyphenols [9]. Several investigations have been conducted to elucidate the mechanism of lipid peroxidation and to develop antioxidants to neutralize cell oxidation in order to prevent food deterioration and biological damages [10]. Currently, a safe alternative to synthetic antioxidants is being a major interest of research [11]. As a consequence, numerous natural sources (aromatic plants, fruits, vegetables, leaves, and spices) have been tested for their antioxidant activity, and OLL is one of these resources [12].

The yield and composition of phenols originated from different resources were found to vary depending on some factors related to the extraction solvent and the operating conditions [13] and also on some other factors associated with the genetic background of the plant [9,14,15]. OLL phenols are mainly extracted using conventional solvents. However, recently, a move toward green methodologies under the name of green solvents, including ionic liquids (ILs) and deep eutectic solvents (DESs) or low-transition temperature mixtures (LTTMs), has emerged [16–18]. These new solvents aim at maximizing extraction efficiency and reaching new purposes such as researcher safety, environmental protection, and the use of a simplified and cheaper extraction procedure [19]. Due to the physicochemical properties of the green solvents (viscosity, density, hydrophilicity, and solubility), the drawbacks of the conventional solvents are overcome. Furthermore, because of their lower cost, DESs are particularly more attractive solvents, compared with the ILs. The DESs are known as a new class of solvents, alternative to ILs, that consists of a mixture of organic compounds with a melting point lower than that of either individual component [20].

The present work was carried out to optimize OLL polyphenol extraction conditions using DESs based on glycerol, which represents a cheap and biodegradable source material combined with amino acids: lysine, proline, and arginine. A response surface methodology (Box–Behnken design) was implemented in order to assess the effects of the liquid-to-solid ratio ($R_{L/S}$), the concentration of DES (C_{DES}), and the extraction temperature (T) on the yield in total phenols (Y_{TP}). This work also aimed at comparing extraction efficiency among the DESs tested and conventional solvents, in addition to obtaining information regarding the selectivity of the DESs tested and the polyphenolic composition of the extracts.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Glycerol (99.5%) was from Penta. Arginine (>98%) was from Acros Organic. Lysine (>98%) and proline (>99%), hydroxytyrosol (>98%), tyrosol (98%), oleuropein (>98%), sodium carbonate, and gallic acid were from Sigma-Aldrich. Rutin ($\geq 99\%$) and luteolin-7-O-glucoside ($\geq 98\%$) were from Extrasynthese. Folin Ciocalteu phenol reagent was from Fluka. All solvents (methanol ($\geq 99.9\%$), water) used for chromatographic purposes were HPLC grade and supplied by Honeywell Riedel-de Haen.

2.2. Plant Material

Olive leaves of *Olea europaea* L. (Koroneiki variety) were collected by hand from the garden of the Mediterranean Agronomic Institute of Chania, Greece. The leaves were dried in the oven at 50 °C for 24 h until stable mass, subsequently they were ground in a simple blender and sieved to yield a powder with a particle size less than 180 microns. The powder was stored in a stoppered glass vial at room temperature, in the dark, until used.

2.3. Synthesis of DES

DESs were synthesized following standard procedures, as described in [21]. Glycerol (hydrogen bond donor, HBD) was mixed with each amino acid (lysine, proline, and arginine), which served as a hydrogen bond acceptor (HBA), at different molar ratios ($R_{mol}^{D/A}$) in order to reach the optimum HBD:HBA ratio. The mixtures were heated at 70 °C under

stirring (500 rpm) until the formation of a perfectly transparent liquid. DESs were stored in sealed glass vials in the dark, at room temperature. DESs were checked frequently for their stability or crystal formation during a period of at least one month.

2.4. Process Optimization and Batch Extraction Procedure

A response surface methodology [22] was employed by implementing a Box–Behnken design (BBD) to investigate the effect of $R_{L/S}$, C_{DES} , and T on the yield of total polyphenols extraction. The levels of the selected independent variables $R_{L/S}$, C_{DES} , T designated X_1 , X_2 , X_3 , respectively, are analytically presented in Table 1. The variables were coded at three levels -1 (lower limit), 0 (midrange), and $+1$ (upper limit), based on the following equation [22]:

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i}, I = 1, 2, 3 \quad (1)$$

where x_i and X_i represent the dimensionless and the actual value of the variable i . X_0 is the actual value of the variable i in the central point of the design, and ΔX_i is the variation between the actual value in the central point and the actual value in the upper or lower level of the variable.

The range of the values for the three variables was chosen on the basis of literature data, and the Y_{TP} was the response of interest. Analysis of variance (ANOVA) was used to assess the statistical significance of the obtained mathematical models. Additionally, the desirability function optimization approach was applied to determine the optimum variable setting that would meet the overall desirability of the Y_{TP} .

The fitted models were subjected to the lack of fit test, which was used to determine whether the models were adequate to describe the observed data [23]. The coefficient of determination (r^2) was also determined for the model to indicate the percentage of the variability of the optimization parameter explained by the model. A value of r^2 closer to unity shows a better predictive power of the model [24]. Furthermore, the validity of the mathematical model is determined by the closeness of the measured value obtained under optimum conditions to the predicted value of the developed model [25].

Table 1. The values of the independent variables used for the experimental design.

Independent Variables	Code Units	Coded Variable Level		
		-1	0	$+1$
$R_{L/S}$ (mL g ⁻¹)	X_1	50	100	150
C_{DES} (% w/v)	X_2	60	75	90
T (°C)	X_3	40	60	90

Extractions were carried out with an adequate volume of solvent, according to the design points of each model, composed of various combinations of the DESs with water and at different $R_{L/S}$ as given by the experimental design. All extractions were performed in an oil bath (± 0.5 °C) under continuous stirring at 900 rpm for 150 min. Extraction under the optimum conditions, with 70% (v/v) ethanol, 70% (v/v) methanol, and 100% water, was also used in order to compare the total phenol yield by DESs and conventional solvents.

2.5. Determination of Total Polyphenol

Total polyphenol yield (Y_{TP}) was determined using the Folin Ciocalteu reagent and expressed as mg gallic acid equivalents (GAEs) per g of dry mass. An aliquot of 0.78 mL of distilled water, 0.02 mL of sample, and 0.05 mL of Folin–Ciocalteu reagent were mixed. After exactly 1 min, 0.15 mL of aqueous sodium carbonate (20%, w/v) was added, and the mixture was allowed to stand at room temperature in the dark, for 60 min. The absorbance was read at 750 nm. The total polyphenol concentration (C_{TP}) was calculated from a calibration curve, using gallic acid as a standard. Yield in total polyphenols (Y_{TP})

was determined as mg gallic acid equivalents (GAEs) per g of dry mass (dm), using the following equation:

$$Y_{TP} \text{ (mg GAE g}^{-1} \text{ dm)} = \frac{C_{TP} \times V}{m} \quad (2)$$

where V is the volume of the extraction medium (L), and m the dry mass of the material (g) [26].

2.6. Liquid Chromatography–Tandem-Mass Spectrometry (LC–MS/MS)

For the separation and detection of the compounds of interest, a TSQ Quantum Access MS/MS detector was employed, coupled with a Surveyor LC pump (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The separation was achieved by a Superspher RP-18 column, 125 mm × 2 mm, 4 μm, at 40 °C, with a 10 μL injection loop. The mobile phases utilized were (A) water (1% acetic acid) and (B) methanol (1% acetic acid). The flow rate was 0.3 mL min^{−1}, and a linear gradient elution program was used, as follows: 0 min, 5% B; 35 min, 100% B. Mass spectra acquisition was performed in negative ionization mode, capillary temperature 300 °C, sheath gas pressure 30 (arbitrary units), auxiliary gas pressure 15 (arbitrary units), and collision pressure at 1.5 mTorr. The standards we used were oleuropein, hydroxytyrosol, tyrosol, luteolin-7-O-glucoside, and rutin. The quantitation of the compounds was accomplished by external standard calibration curves using the highest intensity fragment that was produced during the collision-induced dissociation (CID) of the selected precursor molecular ion (Table 2).

Table 2. Calibration curves and collision-induced dissociation fragment intensities.

Compounds	Equation of External Calibration Curve	Correlation Coefficient	Molecular Ion	Fragment Ion 1	Fragment Ion 2
			M-1	(quantifier)	(qualifier)
Oleuropein	$Y = 4920.6x + 109,162$	$r^2 = 0.9957$	539	275	377
Hydroxytyrosol	$Y = 425.38x - 1387.8$	$r^2 = 0.9994$	153	122.2	123.2
Tyrosol	$y = 1977.8x - 5810.1$	$r^2 = 0.9992$	137	106.2	119.1
Luteolin-7-O-glucoside	$Y = 8567.3x + 10782$	$r^2 = 0.9996$	447	284	285
Rutin	$y = 13,579.286x + 100,080.787$	$r^2 = 0.9984$	609	300	270.9

2.7. Statistics

Extractions were repeated twice, and all determinations were performed at least in triplicate. The values obtained were averaged. Experimental design and response surface statistics were performed with JMPTM Pro 13 (SAS, Cary, NC, USA). Linear and non-linear regressions were performed with Sigma PlotTM 12.0, at least at a 95% significance level ($p < 0.05$).

3. Results and Discussion

3.1. DES Synthesis

The number of DESs is continually increasing due to the use of different combinations of donors and acceptors of hydrogen bonds [27,28]. Natural products (organic acids, amino acids, sugars, choline, and urea) are preferentially used to synthesize DESs for their low toxicity profile and many other advantages [28]. In this study, three mixtures of glycerol (HBD) with three amino acids (lysine, proline, and arginine) (HBA) were prepared at different molar ratios preceded by a screening of the $R_{mol}^{D/A}$ for all three DESs.

GL–amino acids mixtures were tested with $R_{mol}^{D/A}$ in the range from 1:1 to 11:1. A transparent mixture was obtained with glycerol:lysine DES (GL–Lys) and glycerol:proline DES (GL–Pro) solvents with all the ratios tested. However, only the (7:1) molar ratio could give a transparent mixture in the case of glycerol:arginine DES (GL–Arg). In order to choose the $R_{mol}^{D/A}$ in this study, different extractions were performed and the total polyphenol

yield was considered for all mixtures tested. The selection of the $R_{\text{mol}}^{\text{D/A}}$ was based on the highest total phenol value. GL–Arg was synthesized at a molar ratio of HBD:HBA (7:1), whereas GL–Lys and GL–Pro were prepared at a (3:1) HBD:HBA molar ratio. Lower $R_{\text{mol}}^{\text{D/A}}$ than the ones used in this study resulted in crystallized mixtures in the case of GL–Arg and impracticable DESs in the case of GL–Lys and GL–Pro, due to the high viscosity. Consequently, homogeneous conditions could not be maintained for all DESs, and therefore, the effect of the molar ratio could be an explicative factor of the results. The mixtures were allowed to stand at room temperature for several weeks for stability checking before extraction.

3.2. Extraction Process Optimization

It has been reported in many investigations that the variables $R_{L/S}$, C_{DES} , and T play an important role regarding the extraction of phenolic compounds in general [29]. In order to investigate the combined effect of the independent variables on OLL polyphenol extraction, a BBD process was applied to find the optimized values of the variables $R_{L/S}$, C_{DES} , and T . Fifteen experiments with 3 center points were carried out for different combinations of the variables using statistically designed experiments; the results are shown in Table 3, which includes the design with the experimental and predicted values. The distribution of the data was analyzed for normality using the Shapiro–Wilk test and also for the presence of outliers. The analysis reported zero outliers among all the data, and the normality conditions were only proven for GL–Lys and GL–Pro model values ($p = 0.98$, $p = 0.72$, respectively), whereas a significant $p = 0.0147$ was observed for GL–Arg. Bias in the coefficient estimates and standard errors are some of the consequences if the normality assumption is not satisfied. Consequently, this may lead to wrong conclusions regarding the confidence intervals and significance tests [30].

In order to fit a Gaussian distribution, the Y_{TP} values of the GL–Arg model were subjected to a mathematical transformation. One of the statistical goals for transforming data is to obtain symmetrical values that help in conditioning and enabling easier data analysis for subsequent stages [31]. The appropriate transformation is chosen through trial and error until the values have a normal distribution. In this study, the Y_{TP} values of the GL–Arg model were converted using the Box–Cox transformation [32,33]. The transformation has the following form:

$$Y(\lambda) = \begin{cases} \frac{y^\lambda - 1}{\lambda}, & \text{if } \lambda \neq 0; \\ \log y, & \text{if } \lambda = 0. \end{cases} \quad (3)$$

where Y is the transformed value, the parameter lambda (λ) defines a particular transformation, which can be a square root when lambda = 0.5 or natural log when lambda = 0. The optimal lambda was chosen within a $[-2, 2]$ interval with jumps of 1/10 [34]. On the basis of the smallest standard deviation obtained, the optimal value of lambda was found to be at (-1.2) . The application of this conversion allowed an insignificant p -value ($p = 0.09468$) for the Shapiro–Wilk test; therefore, it had normalized the data and satisfied the assumption of the test. All subsequent analysis regarding the GL–Arg model was based on the transformed values.

Table 3. Coded and uncoded Box–Behnken design with the observed and predicted data.

Design Point	Independent Variables			Polyphenols Yield (Y_{TP} , mg GAE g^{-1} dm)					
	$R_{L/S}$ (X_1 , mL g^{-1})	C_{DES} (X_2 , % w/v)	T (X_3 , °C)	GL–Lys		GL–Pro		GL–Arg	
				Measured	Predicted	Measured	Predicted	Measured *	Predicted *
1	50(−1)	90(+1)	60(0)	124.58	123.65	78.59	79.84	80.86	78.68
2	100(0)	75(0)	60(0)	131.91	133.49	73.99	74.63	73.11	74.81
3	50(−1)	75(0)	40(−1)	101.50	100.40	61.87	62.28	70.10	72.61
4	150(+1)	75(0)	80(+1)	191.60	139.70	87.81	87.40	114.93	112.39
5	50(−1)	75(0)	80(+1)	146.70	144.40	79.21	77.80	95.53	96.93
6	150(+1)	90(+1)	60(0)	165.21	160.89	84.39	84.63	88.07	89.81
7	50(−1)	60(−1)	60(0)	92.37	96.70	67.45	67.20	75.96	74.23
8	100(0)	60(−1)	80(+1)	153.50	151.47	76.79	78.45	98.03	98.37
9	150(+1)	60(−1)	60(0)	146.00	146.93	78.86	77.61	74.91	77.10
10	100(0)	90(+1)	40(−1)	120.32	122.36	72.41	70.76	74.51	74.17
11	100(0)	60(−1)	40(−1)	114.00	110.77	59.77	59.61	67.40	66.60
12	100(0)	75(0)	60(0)	136.65	133.49	75.92	74.63	76.62	74.81
13	150(+1)	75(0)	40(−1)	136.26	138.60	66.48	67.89	72.62	71.14
14	100(0)	75(0)	60(0)	131.91	133.49	73.99	74.63	74.69	74.81
15	100(0)	90(+1)	80(+1)	177.54	180.79	86.80	86.96	107.16	107.96

* untransformed data.

On the basis of the Box–Behnken experimental design model, an empirical relationship expressed by a second-order-polynomial equation with interaction terms was fitted between the obtained experimental design and the input variables. The final equations in terms of coded significant variables and interactions are given in Table 4.

Table 4. Polynomial equations and statistical parameters calculated after implementation of the design.

DES	Second Order Polynomial Equations	r^2	p
GL–Lys	$Y_{TP} = 133.49 + 10.22 X_1 + 21.86 X_2 + 24.78 X_3 + 10.04 X_3^2$	0.99	0.0002
GL–Pro	$Y_{TP} = 74.63 + 4.91 X_1 + 3.80 X_2 + 8.76 X_3$	0.98	0.0006
GL–Arg	$Y_{TP} = 0.83 + 2.64 \times 10^{-4} X_1 + 1.55 \times 10^{-4} X_2 + 9.06 \times 10^{-4} X_3 + 1.98 \times 10^{-4} X_2^2 + 4.36 \times 10^{-4} X_3^2$	0.99	0.0002

X_1, X_2, X_3 : main effects; X_2^2, X_3^2 : quadratic effects.

It is obvious that the models explain 99%, 98%, and 99% in polyphenol extraction yield ($r^2 = 0.99$ for GL–Lys, $r^2 = 0.98$ for GL–Pro, and $r^2 = 0.99$ for GL–Arg) and have relatively small amounts of random error or root-mean-square error (RMSE); RMSE = 4.3927 for GL–Lys, 1.7598 for GL–Pro and 0.0001 for GL–Arg. This leads to the conclusion that the developed models were highly significant.

The lack of fit test is another parameter to support mathematical model validity. This test is used to detect the existence of observations that have a poor fit to the model, even if the overall trend is highly significant [35]. The lack of fit is found to be insignificant when limited observations are outside of the shaded confidence interval region of the actual by-predicted plots. In this study, the models are found to be robust for all cases since all the observations were within the trend of the interval, and a maximum r^2 is reached for GL–Lys ($r^2 = 0.9985$, $p = 0.2235$); GL–Pro ($r^2 = 0.9958$, $p = 0.5723$); GL–Arg ($r^2 = 0.9979$, $p = 0.2223$). The coefficient of variation (CV) and the coefficient of correlation between the measured and the predicted values were determined to assess the goodness of the fit of the models. The results (CV, %, 3.13 GL–Lys, 2.35 GL–Pro, and 0.01 GL–Arg) indicated low CV, which suggests that the deviations between the experimental and the predicted values are low [36]. The low CV values along with the r^2 presented in Table 4 are strong indications that the developed models presented adequate reliability and precision.

The measured experimental values under optimum conditions were compared with the predicted values (Table 5). Values from the experiments carried out at the predicted conditions were close to the predicted values in the case of GL–Lys and GL–Arg, and the difference between the two values (experimental and predicted) did not have a practical significance on the good fit of the two models. This small difference could be due to an uncontrolled source of variation during the extraction process (temperature, stirring, etc.) or minor experimental errors, whereas the measured value for GL–Pro was in the range of the predicted values. Considering the entire statistical parameters for model verification, it can be concluded that these results indicated valid and suitable mathematical prediction models for the optimization of polyphenol extraction conditions.

Table 5. Optimal predicted conditions and comparison of experimental and predicted values on the Y_{TP} in all DESs tested. Extractions were performed under stirring (900 rpm) for 150 min.

DES	Interval Predicted Values (mg g ⁻¹)	Observed Value * (mg g ⁻¹)	Optimal Conditions		
			R_{LS} (mL g ⁻¹)	C_{DES} (% w/v)	T (°C)
GL–Lys	[189.58, 216.27]	188.39 ± 0.37	150	90	80
GL–Pro	[86.31, 97.00]	95.97 ± 0.74	150	90	80
GL–Arg	[0.83053, 0.8313] ^a [112.48, 129.68] ^b	0.83002 ± 0.47 ^a 100.01 ± 1.98 ^b	150	90	80

* Mean ± standard deviation of triplicate determinations from predicted optimum experiments a: Box–Cox transformed data; b: untransformed data.

Furthermore, the experimental design enabled the detection of a statistical significance in the quadratic coefficient X_3^2 (T) in two models including GL–Lys and GL–Arg and no cross effect among the variables. Additionally, the obtained results supported that all the variables (X_1 , X_2 , X_3) have a significant effect ($p < 0.05$) on the extraction process, as also reported in the literature. This outcome can be visualized through the prediction profilers, which examine the dynamic relationships among all the inputs and outputs simultaneously (Figure 1). The prediction profilers present a general curvature trend of the model profile lines, which illustrates the non-linear responses of the model's effects. An observed increase in every single variable led to an increased response in all three DESs tested.

Desirable Y_{TP} was achieved under $R_{L/S}$ 150 mL g⁻¹, C_{DES} 90% w/v , and T 80 °C in all three DESs by the desirability function, which produced the maximum overall desirability of 0.992, 0.995, and 0.958 for of GL–Lys, GL–Pro and GL–Arg, respectively.

The findings herein indicated that $R_{L/S}$, C_{DES} , and T strongly affect the extraction yield of polyphenols from OLL. The $R_{L/S}$ parameter showed a high significance, which is in agreement with previous investigations that have reported the importance of proportionality between the plant material and the solvent in the extraction optimization processes [37]. This key parameter displays a major role in diffusional phenomena, which largely defines the course of extraction and yield. A high extraction yield is usually observed when a larger proportion of liquid phase is used since polyphenols are more solubilized, and a saturation concentration is achieved [38,39].

In this work, the optimal $R_{L/S}$ (150 mL g⁻¹) was higher than the values reported in the literature, which usually varied between 10 and 45 mL g⁻¹ using DESs and also higher than those of conventional solvents that can reach 120 mL g⁻¹ in some investigations [40,41]. The observed discrepancies among scientific works regarding the value of the optimum $R_{L/S}$ could originate from the variation in the extraction solvent and the experimental conditions (temperature, stirring, time extraction, etc.), the $R_{L/S}$ range selected, and, most likely, the source of polyphenols. Although a common objective is to optimize the extraction of polyphenols, the different extraction conditions could affect the determination of the $R_{L/S}$ optimum value and, consequently, the comparison herein. Similar to $R_{L/S}$, C_{DES} showed a high significance regarding the extraction yield of polyphenols from OLLs. The optimum level of C_{DES} was the same in all three DESs in this study (90% w/v , Table 5) meaning that the amount of water (C_w) required to attain a maximum yield is the same in all cases. Water addition to DESs is one of the ways to tailor the physicochemical properties of DESs. Thus, fine-tuning the C_w is central to adjusting DESs properties, such as viscosity and polarity that significantly affect the yield of extraction [42].

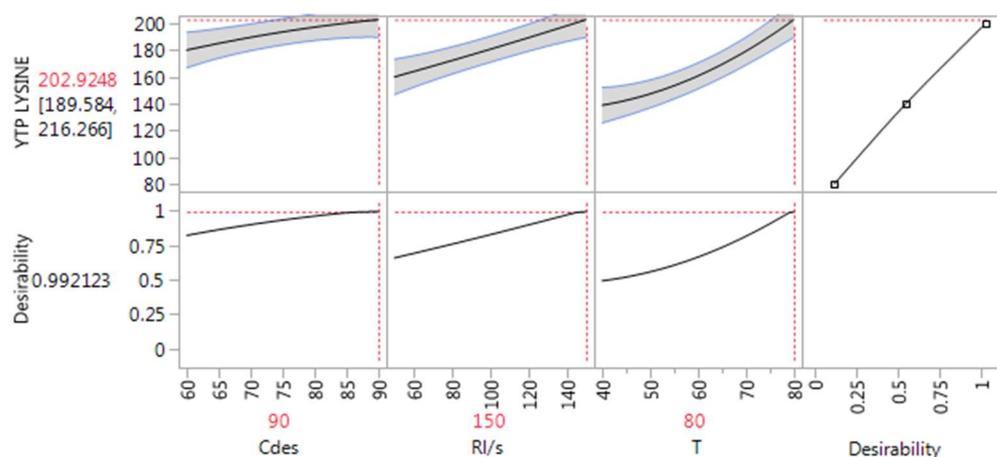


Figure 1. Cont.

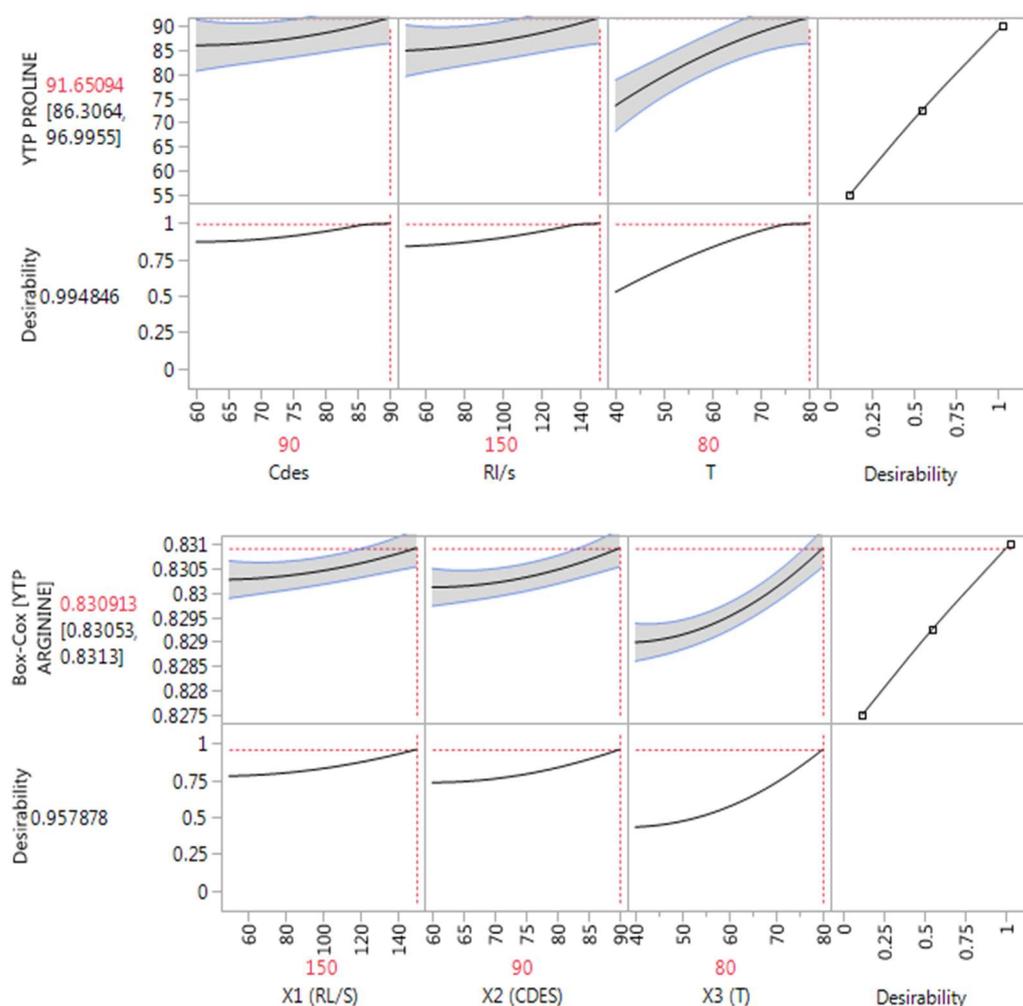


Figure 1. Prediction profilers displaying the overall desirability of GL–Lys, GL–Pro (untransformed data), and GL–Arg DESs (transformed data) along with the optimum $R_{L/S}$, C_{DES} , and T values.

Recent studies have estimated the optimal C_w to vary from 10% to 50% [43], reaching even 63.8% by Jancheva et al. [44]. It has been noted that water addition to DESs up to a certain point and above the optimal C_w could negatively affect the extraction yield since a large amount of water could cause hydrogen bonds to rupture between HBD and HBA [45].

The outcome with regard to the optimum C_w values was found to be 10% (v/v) for all three DESs tested. This information suggests that all three HBAs tested are equally demanding in water and the differences in the structure and the physicochemical properties of lysine, proline, and arginine did not affect the polarity of the DESs. Such an outcome was rather contradictory with published information that supported differences in C_w using HBAs with different chain lengths. It has been found that the longer the chain, the higher the amount of water required [46]. Hence, the basis behind the efficiency difference of the three DESs herein would be related to another reason such as the pH of the extraction medium [47]. The alkalinity offered by the amino acids provided a more or less alkaline environment to ionize polyphenols, which may turn them more polar and soluble in the solvent. Lysine, proline, and arginine have the corresponding pK_a , 10.57, 10.47, and 12.10, respectively. The result expected on the basis of the claimed explanation would be the order of GL–Arg, GL–Lys, and lastly, GL–Pro in terms of solvent efficiency. However, the actual order obtained was GL–Lys, GL–Arg, and lastly, GL–Pro, which only explains the GL–Lys and GL–Pro order. This outcome suggests the existence of another important factor regarding GL–Arg. It has been underlined that increasing the $R_{mol}^{D/A}$ up to a certain point could favor polyphenol extraction due to the decrease in viscosity and

higher diffusivity [48]. Thus, using a higher $R_{\text{mol}}^{\text{D/A}}$ of (7:1) in the case of GL–Arg, compared with a $R_{\text{mol}}^{\text{D/A}}$ of (3:1) in the case of GL–Lys and GL–Pro appears as evidence that the $R_{\text{mol}}^{\text{D/A}}$ is of a significant influence on polyphenol extraction optimization processes. Operating in similar optimal extraction conditions, the extraction with GL–Lys yielded 54.83% and 40.32% higher Y_{TP} , compared with that attained with GL–Pro and GL–Arg, respectively, whereas, extraction with GL–Arg afforded 24.32% higher Y_{TP} , compared with that attained with GL–Pro. This finding suggests the suitability of the GL–Lys for efficient polyphenol extraction, which would possess stronger hydrogen bonding with polyphenols of the plant material regardless of its $R_{\text{mol}}^{\text{D/A}}$ and the alkalinity condition, compared with the other solvent essayed [49,50]. As a result, it could be concluded that the observed difference in polyphenol yield is mainly attributed to the hydrogen bond acceptors used in this study. Consequently, tailoring the physicochemical properties of the HBAs would be promising in order to enhance polyphenol extraction.

With regard to the temperature effect, an observed favorable effect on polyphenol extraction is reported. Indeed, increasing temperature has shown to lead to an increase in polyphenol extraction yield by improving solubility and hydrolytic reactions [51,52]. This is in accordance with the outcome of the present work. A high significance was observed in all three DESs, and the same optimum extraction temperature (80 °C) was determined. These results showed a similarity with the investigations of Bucić-Kojić et al. [53], who found the highest polyphenol extraction at 80 °C. In addition to this finding, other investigations on kinetics portrayed that diffusion is directly proportional to temperature and follows the Arrhenius law [54,55]. However, at temperatures higher than a certain point, with longer exposure times, it would reduce the polyphenol extraction yield and diversity. That temperature level varies in different scientific works, which probably depends on the extraction solvent and plant material, along with some other related factors as well [56]. Figure 2 illustrates the effect of the experimental variables on the extraction yield through a 3D plot.

3.3. Total Polyphenol Analysis

Total phenolics were determined after 150 min of extraction. The purpose was to compare the efficiency of the synthesized DESs. The total phenolic content of all DESs extracts was found to be higher than that of ethanol (70% v/v), methanol (70% v/v), and water occurring in the same extraction conditions (Figure 3). Comparison carried out among the DESs tested informed about the optimum Y_{TP} response and conditions to extract polyphenols from olive leaves. The results exhibited the highest antioxidant activity at similar operational extraction conditions in all three DESs, which were $R_{L/S} = 150 \text{ mL g}^{-1}$, $C_{\text{DES}} = 90\%$, and $T = 80 \text{ °C}$.

The DESs tested were not equally efficient with respect to conventional solvents. GL–Lys was found to be the most efficient solvent system for OLL phenol extraction among the DESs tested and the conventional solvents. GL–Arg was slightly better than GL–Pro. The results displayed the Y_{TP} : 188.39, 100.01, and 95.96 $\text{mg g}^{-1} \text{ GAE dm}$ for GL–Lys, GL–Arg, and GL–Pro, respectively, compared with 65.95, 62.27, and 52.97 $\text{mg g}^{-1} \text{ GAE dm}$ corresponding to ethanol, methanol, and water Y_{TP} , respectively. It should be noted that the extraction with GL–Lys allowed 64%, 66.01%, and 71.09% higher Y_{TP} , compared with that attained with ethanol, methanol, and water in the given order. This outcome indicates the efficiency of GL–Lys among the other DESs tested and the conventional solvents as well regarding polyphenol extraction. This result is in accordance with the literature in which a greater extractability with DESs is demonstrated than with conventional solvents [57]. The reason for this difference could be strongly associated with the physicochemical properties of the amino acids used (HBAs), which would interact more or less favorably with glycerol during the preparation process and also with the polyphenols contained in the plant material during the extraction. These intermolecular forces involve hydrogen bonding and even van der Waals interactions [58].

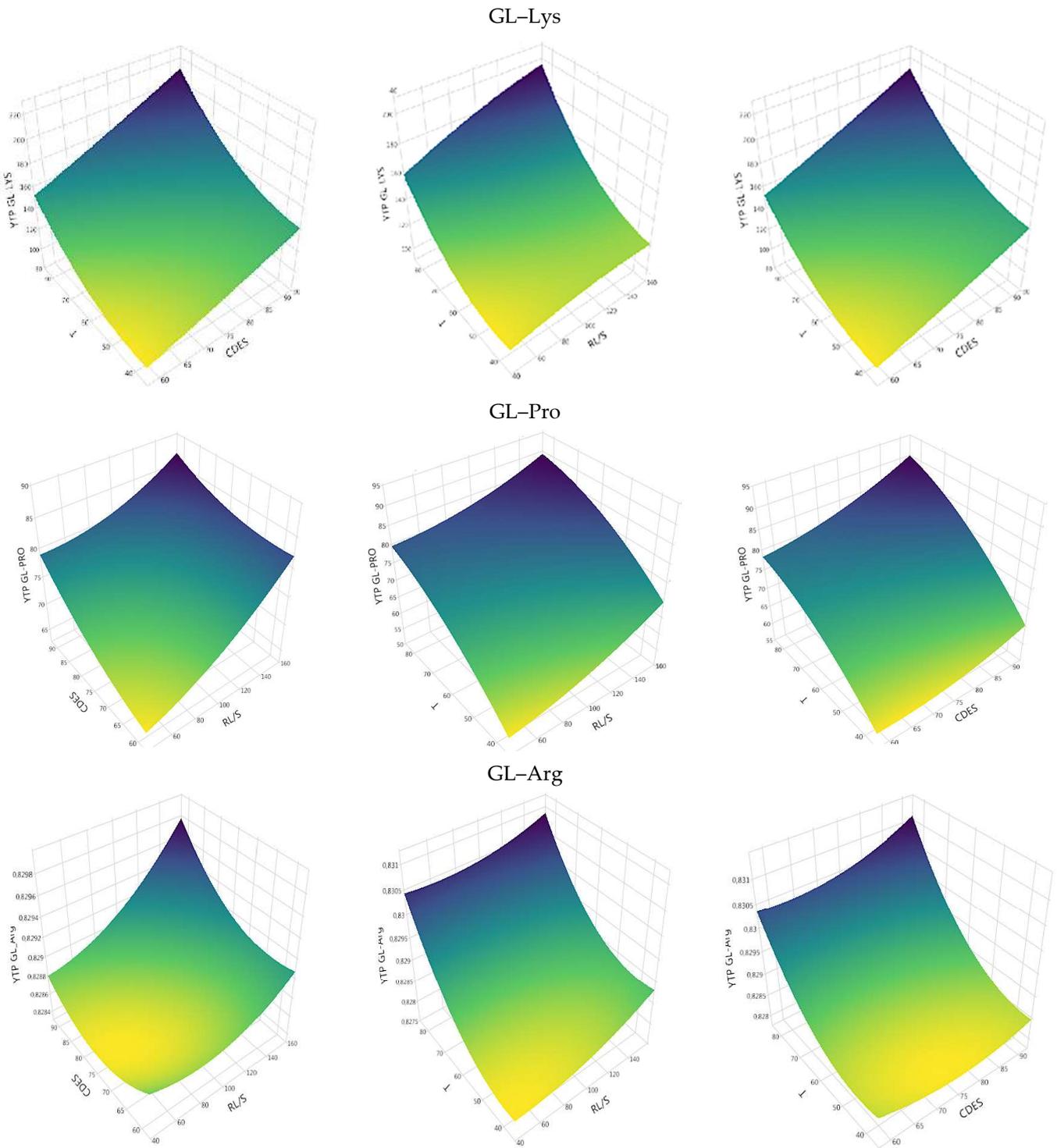


Figure 2. The presented 3D Plots show simultaneous variations in (1) $R_{L/S}$ and C_{DES} , (2) $R_{L/S}$ and T , and (3) C_{DES} and T on the Y_{TP} in all three DESs.

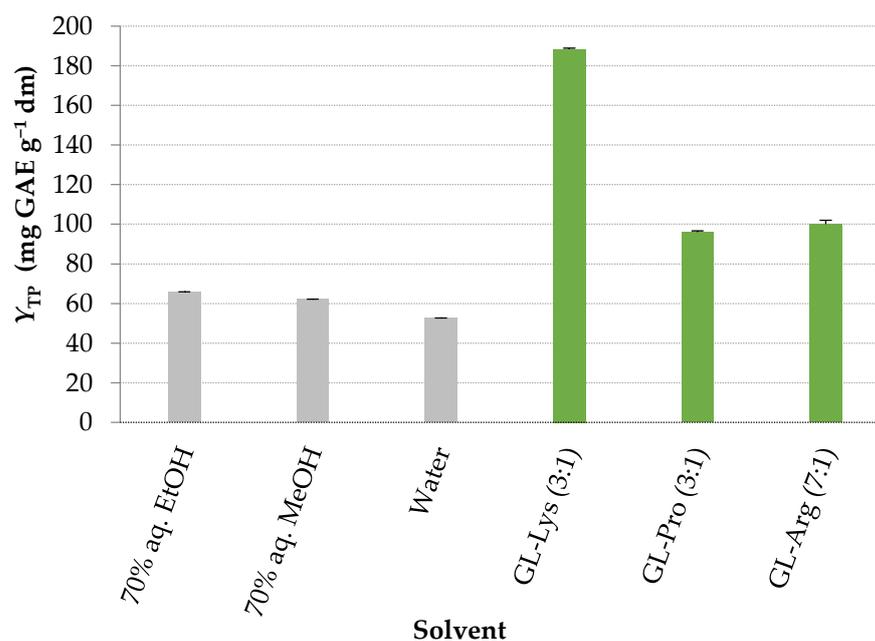


Figure 3. Polyphenol extraction yield using conventional and green solvents. Extractions were carried out under optimal conditions ($R_{L/S} = 150 \text{ mL } g^{-1}$, $C_{DES} = 90\%$, $T = 80 \text{ } ^\circ\text{C}$) and stirring (900 rpm) for 150 min.

3.4. Extract Quantification

Quantification of polyphenol compounds was carried out by LC–MS/MS for the three DES systems and for 70% EtOH. The results are presented in Table 6. The analysis of Table 6 demonstrates an overall polyphenol content that is higher in the case of the DESs than that of the ethanolic solution used, which is in agreement with the total phenolic determination performed by Folin Ciocalteu method, as described above. As regards each compound, the results showed important quantitative differences in tyrosol contents with respect to the values reported in the literature, which are in a range of $90 \mu\text{g } g^{-1}$ to $660 \mu\text{g } g^{-1}$ [59]. Moreover, the amounts of tyrosol in this study were higher than those of hydroxytyrosol and oleuropein. This outcome is not in accordance with previous investigations that reported an opposite trend [60]. This is likely to be explained by the stability of tyrosol, compared with the other phenolic compounds, and probably the selectivity of the solvents used to extract tyrosol [61]. It has been reported that polyphenols can interact with DESs through hydrogen bonds and therefore increase their stability and solubility in DESs whose composition (HBD/HBA) plays a critical role in the extraction efficiency [62]. Additionally, a high and linear correlation was found between tyrosol content and the total phenol content (TPC) in all DES extracts under study (Figure 4). Many factors have been mentioned in relation to the variation in phenolic content of olive leaf extracts such as the extraction procedure, hydric deficiency, salinity, fertilization, geographical zone, sampling time, light exposition, frost stress, leaves age, the olive variety, bacteria, and fungi [63,64].

The amounts of hydroxytyrosol from the OLL extracts in the present study were found to be lower than most of the values found by other authors [65–67], but higher than the amounts recorded in Brahmı et al. (2013) [68]. Similarly, the values of oleuropein content were lower than expected with GL–Lys extract and GL–Arg extract in which oleuropein was not found, but close to some published values in the case GL–Pro and the ethanolic solution [69] and even higher with respect to the findings in [70,71]. Furthermore, the results of this study exhibited a simultaneous increase in hydroxytyrosol concentration and a decrease in oleuropein concentration, which is attributed to the degradation of oleuropein into hydroxytyrosol due to the chemical and enzymatic reactions during olive leaves processing [72]. Regarding luteolin-7-O-glucoside and rutin, their concentration values were within the range of the upper and lower values reported in the literature [73–78]. It

should be noted that the observed differences in the content of the phenolic compounds herein are attributed to the above-mentioned factors.

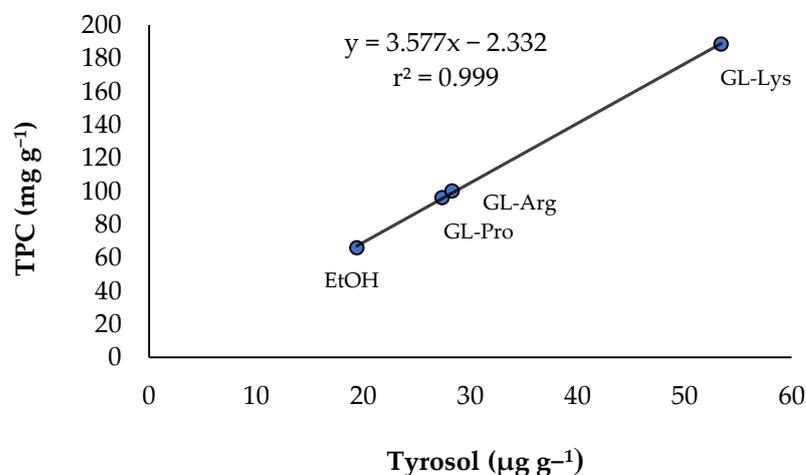


Figure 4. Relationship between total phenolic content and tyrosol concentration.

Table 6. Quantification of phenolic compounds in dry olive leaf extracts ($\mu\text{g g}^{-1}$).

Solvent	Phenolic Compounds Concentrations $\mu\text{g g}^{-1}$				
	Tyrosol	Hydroxytyrosol	Oleuropein	Luteolin-7-O-Glucoside	Rutin
70% aq.EtOH	19398.64 \pm 362.12	205.78 \pm 9.11	7381.03 \pm 52.14	1418.64 \pm 28.74	714.63 \pm 18.25
GL-Lys	53420.23 \pm 1135.12	1687.95 \pm 2.4	n.d	1377.14 \pm 17.25	286.69 \pm 0.69
GL-Pro	27358.48 \pm 175.71	231.95 \pm 9.8	7908.10 \pm 59.45	997.84 \pm 80.51	463.06 \pm 4.92
GL-Arg	28312.65 \pm 445.30	2686.44 \pm 7.9	n.d	1564.97 \pm 63.98	268.59 \pm 33.82

Values are given as a mean of six measurements, followed by standard deviation. n.d: not detected.

4. Conclusions

A new set of deep eutectic solvents, with glycerol as a hydrogen bond donor and lysine, proline, and arginine as hydrogen bond acceptors were synthesized and tested for their extraction capacity for antioxidant polyphenolic compounds from olive leaves (*Olea europaea L.*). To our knowledge, this is the first time these novel DES solvents are tested on olive leaves. Box–Behnken design was applied to optimize the extraction conditions related to liquid/solid ratio, the concentration of DESs, and extraction temperature ($R_{L/S}$, C_{DES} , and T , respectively). The optimal conditions for the best extraction of total phenols were predicted to be $R_{L/S}$, 150 mL g^{-1} , C_{DES} 90 (% w/v) and T 80 °C. The predicted total phenol yield, under optimal conditions (188.39, 100.01, and 95.97 mg g^{-1} GAE dm, corresponding to glycerol–lysine, glycerol–arginine, and glycerol–proline solvent systems, respectively), were matched quite closely by the experimental values obtained. Glycerol–lysine DES was found to be the most effective in extracting phenolic compounds from olive leaf compared with glycerol–arginine DES and glycerol–proline and even to conventional solvents—namely, ethanol (70% v/v), methanol (70% v/v), and water. The results showed that the extraction with glycerol–lysine permitted 40.32%, 54.83%, 64%, 66.01%, and 71.09% higher total phenol yield (Y_{TP}), compared with that reached with glycerol–arginine, glycerol–proline, 70% ethanol, 70% methanol, and water solvents, respectively. Moreover, liquid chromatography–tandem-mass spectrometry analyses proved the high extraction capacity of glycerol–lysine DES and showed a selective behavior toward the quantified phenolic compounds. Overall, the DESs used in this study revealed a favorable extraction for tyrosol with excessive amounts in comparison with previous investigations, but more or less important differences were observed concerning hydroxytyrosol, oleuropein, luteolin-7-O-glucoside, and rutin. The new DESs, designed, synthesized, and tested in this study,

were proven to be successful in general on the extraction of antioxidant polyphenolics from olive leaves, a by-product of a very important industry—olive oil production.

Author Contributions: Conceptualization, N.L.-S., S.G. and D.P.M.; methodology, N.L.-S., S.G., D.P.M. and H.A.; software, H.A. and S.G.; validation, N.L.-S., S.G., D.P.M., A.C. and A.M.; formal analysis, H.A., S.L. and A.K.; investigation, H.A., S.G. and S.L.; resources, N.L.-S., S.G. and D.P.M.; data curation, H.A. and S.G.; writing—original draft preparation, H.A., S.G. and N.L.-S.; writing—review and editing, H.A., S.G., D.P.M., N.L.-S., A.C. and A.M.; visualization, H.A.; supervision, S.G., D.P.M. and N.L.-S.; project administration, S.G.; funding acquisition, S.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Nomenclature

C_{DES}	Proportion of DES/water (%: w/v)
C_w	Water concentration (%: v/v)
RL/S	Liquid-to-solid ratio ($mL\ g^{-1}$)
$R_{mol}^{D/A}$ HBD:HBA	Molar ratio (dimensionless)
T	Temperature ($^{\circ}C$)
Y_{TP}	Yield in total polyphenols ($mg\ GAE\ G^{-1}$)

Abbreviations

ANOVA	Analysis of variance
Arg	Arginine
CV	Coefficient of variance
DES	Deep eutectic solvent
Dm	Dry mass (g)
GAE	Gallic acid equivalents
GL	Glycerol
HBA	Hydrogen bond acceptor
HBD	Hydrogen bond donor
LTTMs	Low-transition temperature mixtures
Lys	Lysine
OLL	Olive leaves
Pro	Proline

References

- Lebersorger, S.; Schneider, F. Discussion on the methodology for determining food waste in household waste composition studies. *J. Waste Manag.* **2011**, *31*, 1924–1933. [[CrossRef](#)]
- Cicatiello, C.; Franco, S.; Pancino, B.; Blasi, E. The value of food waste: An exploratory study on retailing. *J. Retail. Consum. Serv.* **2016**, *30*, 96–104. [[CrossRef](#)]
- Eriksson, M.; Strid, I.; Hansson, P.A. Carbon footprint of food waste management options in the waste hierarchy—a Swedish case study. *J. Clean. Prod.* **2015**, *93*, 115–125. [[CrossRef](#)]
- Papargyropoulou, E.; Lozano, R.; Steinberger, J.K.; Wright, N.; Ujang, Z.B. The food waste hierarchy as a framework for the management of food surplus and food waste. *J. Clean. Prod.* **2014**, *76*, 106–115. [[CrossRef](#)]
- Mirabella, N.; Castellani, V.; Sala, S. Current options for the valorization of food manufacturing waste: A review. *J. Clean. Prod.* **2014**, *65*, 28–41. [[CrossRef](#)]
- Bonilla, J.; Vargas, F.C.; Gomes de Oliveira, T.; Makishi, G.L.D.A.; Sobral, P.J.D.A. Recent patents on the application of bioactive compounds in food: A short review. *Curr. Opin. Food Sci.* **2015**, *5*, 1–7. [[CrossRef](#)]
- Abaza, L.; Taamalli, A.; Nsir, H.; Zarrouk, M. Olive Tree (*Olea europaea* L.) Leaves: Importance and Advances in the Analysis of Phenolic Compounds. *Antioxidants* **2015**, *4*, 682–698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rahmanian, N.; Jafari, S.M.; Wani, T.A. A comprehensive review on the bioactive profile, dehydration, Extraction and application of the bioactive components of olive leaves. *Trends Food Sci. Technol.* **2015**, *42*, 150–172. [[CrossRef](#)]
- Dias, R.; Oliveira, H.; Fernandes, I.; Simal-Gandara, J.; Perez-Gregorio, R. Recent advances in extracting phenolic compounds from food and their use in disease prevention and cosmetics. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2021**, *61*, 1130–1151. [[CrossRef](#)]

10. Niki, E.; Yoshida, Y.; Saito, Y.; Noguchi, N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338*, 668–676. [[CrossRef](#)]
11. Caleja, C.; Barros, L.; Antonio, A.L.; Oliveira, M.B.P.P.; Ferreira, I.C.F.R. A comparative study between natural and synthetic antioxidants: Evaluation of their performance after incorporation into biscuits. *Food Chem.* **2017**, *216*, 342–346. [[CrossRef](#)]
12. Sindhi, V.; Gupta, V.; Sharma, K.; Bhatnagar, S.; Kumari, R.; Dhaka, N. Potential applications of antioxidants. *J. Pharm. Res.* **2013**, *7*, 828–835. [[CrossRef](#)]
13. Mollica, A.; Zengin, G.; Stefanuccia, A.; Ferrante, C.; Menghinia, L.; Orlando, G.; Brunetta, L.; Locatelli, M.; Dimmito, M.P.; Novellinoc, E.; et al. Nutraceutical potential of *Corylus avellana* daily supplements for obesity and related dysmetabolism. *J. Funct. Foods* **2018**, *47*, 562–574. [[CrossRef](#)]
14. Dykes, L.; Rooney, L.L.; Waniska, R.D.; Rooney, W.L. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Sorghum Grains of Varying Genotypes. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6813–6818. [[CrossRef](#)]
15. Do, Q.D.; Angkawijaya, A.E.; Tran-Nguyen, P.L.; Huynh, L.H.; Soetaredjo, F.E.; Ismadi, S.; Ju, Y.-H. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoids content, and antioxidant activity of *Limonophila aromatic*. *J. Food Drug Anal.* **2013**, *22*, 296–302. [[CrossRef](#)]
16. Pena-Pereira, F.; Namieśnik, J. Ionic Liquids and Deep Eutectic Mixtures: Sustainable Solvents for Extraction Processes. *Chem. Sustain. Chem.* **2014**, *7*, 1784–1800. [[CrossRef](#)]
17. Shishov, A.; Bulatov, A.; Locatelli, M.; Carradori, S.; Andruch, V. Application of deep eutectic solvents in analytical chemistry. *Microchem. J.* **2017**, *135*, 33–38. [[CrossRef](#)]
18. Merone, G.M.; Tartaglia, A.; Rosato, E.; D’Ovidio, C.; Kabir, A.; Ulusoy, H.I.; Savini, F.; Locatelli, M. Ionic Liquids in Analytical Chemistry: Applications and Recent Trends. *Curr. Anal. Chem.* **2021**, *17*, 1340–1355. [[CrossRef](#)]
19. Abbott, P.; Boothby, D.; Capper, G.; Davies, D.L.; Rasheed, R.K. Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9142–9147. [[CrossRef](#)]
20. Paiva, A.; Craveiro, R.; Aroso, I.; Martins, M.; Reis, R.L.; Duarte, A.R.C. Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2014**, *2*, 1063–1071. [[CrossRef](#)]
21. Cunha, S.C.; Fernandes, J. Extraction techniques with deep eutectic solvents. *Trends Anal. Chem.* **2018**, *105*, 225–239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Bezerra, M.A.; Santelli, R.E.; Oliveira, E.P.; Villar, L.S.; Escalera, L.A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* **2008**, *76*, 965–977. [[CrossRef](#)]
23. Garg, L.K.; Reddy, V.S.; Sait, S.S.; Krishnamurthy, T.; Vali, S.J.; Reddy, A.M. Quality by Design: Design of Experiments Approach Prior to the Validation of a Stability-Indicating HPLC Method for Montelukast. *Chromatographia* **2013**, *76*, 1697–1706. [[CrossRef](#)]
24. Yetilmezsoy, K.; Demirel, S.; Vanderbei, R.J. Response surface modeling of Pb (II) removal from aqueous solution by *Pistacia vera* L.: Box–Behnken experimental design. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *171*, 551–562. [[CrossRef](#)]
25. Joseph Davidson, M.; Balasubramanian, K.; Tagore, G.R.N. Surface roughness prediction of flow-formed AA6061 alloy by design of experiments. *J. Mater. Process. Technol.* **2008**, *202*, 41–46. [[CrossRef](#)]
26. Karakashov, B.; Grigorakis, S.; Loupassaki, S.; Makris, D.P. Optimisation of polyphenol extraction from *Hypericum perforatum* (St. John’s Wort) using aqueous glycerol and response surface methodology. *J. Appl. Res. Med. Arom. Plants* **2015**, *2*, 1–8. [[CrossRef](#)]
27. García, A.; Rodríguez-Juan, E.; Rodríguez-Gutiérrez, G.; Rios, J.J.; Fernández-Bolaños, J. Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESs). *Food Chem.* **2016**, *197*, 554–561. [[CrossRef](#)]
28. Dai, Y.; Van Spronsen, J.; Witkamp, G.J.; Verpoorte, R.; Hae Choi, Y. Natural Deep Eutectic Solvents as New Potential Media for Green Technology. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *766*, 61–68. [[CrossRef](#)]
29. Xia, B.; Yan, D.; Bai, Y.; Xie, J.; Cao, Y.; Liao, D.; Lin, L. Determination of phenolic acids in *Prunella vulgaris* L. a safe and green extraction method using alcohol-based deep eutectic solvents. *Anal. Methods* **2015**, *7*, 9354–9364. [[CrossRef](#)]
30. Glass, G.V.; Peckham, P.D.; Sanders, J.R. Consequences of failure to meet assumptions underlying the fixed effects analyses of variance and covariance. *Educ. Res. Rev.* **2012**, *42*, 237–288. [[CrossRef](#)]
31. Tsai, A.C.; Liou, M.; Simak, M.; Cheng, P.E. On hyperbolic transformations to normality. *Comput. Stat. Data Anal.* **2017**, *115*, 250–266. [[CrossRef](#)]
32. Malaeb, Z.A. A SAS code to correct for non-normality and non-constant variance in regression and anova models using the Box–Cox method of power transformation. *Environ. Monit. Assess.* **1997**, *47*, 255–273. [[CrossRef](#)]
33. Asar, Ö.; İlk, O.; Dag, O. Estimating Box–Cox power transformation parameter via goodness of fit tests. *Commun. Stat. Simul. Comput.* **2014**, *46*, 91–105. [[CrossRef](#)]
34. Ishak, N.A.M.; Ahmad, S. Estimating Optimal Parameter of Box–Cox Transformation in Multiple Regression with Non-normal Data. In *Regional Conference on Science, 1st ed.; Technology and Social Sciences (RCSTSS 2016)*, Yacob, N.A., Mohd Noor, N.A., Mohd Yunus, N.Y., Lob Yussof, R., Zakaria, S.A.K.Y., Eds.; Springer: Singapore, 2018; pp. 1039–1046. [[CrossRef](#)]
35. Bischoff, W.; Miller, F. Optimal designs which are efficient for lack of fit tests. *Ann. Stat.* **2006**, *34*, 2015–2025. [[CrossRef](#)]
36. Ramić, M.; Vidović, S.; Zeković, Z.; Vladić, J.; Cvejic, A.; Pavlić, A. Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from *Aronia melanocarpa* by-products from filter-tea factory. *Ultrason. Sonochem.* **2014**, *23*, 360–368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

37. Rakotondramasy-Rabesiaka, L.; Havet, J.L.; Porte, C.; Fauduet, H. Estimation of effective diffusion and transfer rate during the protopine extraction process from *Fumaria officinalis* L.. *Sep. Purif. Technol.* **2010**, *76*, 126–131. [[CrossRef](#)]
38. Katsampa, P.; Valsamedou, E.; Grigorakis, S.; Makris, D. A green ultrasound-assisted extraction process for the recovery of antioxidant polyphenols and pigments from onion solid wastes using Box–Behnken experimental design and kinetics. *Ind. Crop. Prod.* **2015**, *77*, 535–543. [[CrossRef](#)]
39. Chakroun, D.; Grigorakis, S.; Loupassaki, S.; Makris, D.P. Enhanced-performance extraction of olive (*Olea europaea*) leaf polyphenols using L-lactic acid/ammonium acetate deep eutectic solvent combined with β -cyclodextrin: Screening, optimisation, temperature effects and stability. *Biomass Convers. Biorefinery* **2021**, *11*, 1125–1136. [[CrossRef](#)]
40. Vetel, M.D.; Lade, V.G.; Rathod, V.K. Extraction of ursolic acid from *Ocimum sanctum* by ultrasound: Process intensification and kinetic studies. *Chem. Eng. Process. Process. Intensif.* **2013**, *69*, 24–30. [[CrossRef](#)]
41. Dedousi, M.; Mamoudaki, V.; Grigorakis, S.; Makris, D.P. Ultrasound-assisted extraction of polyphenolic antioxidants from olive (*Olea europaea*) leaves using a novel glycerol/sodium-potassium tartrate low-transition temperature mixture (LTTM). *Environments* **2017**, *4*, 31. [[CrossRef](#)]
42. Dai, Y.; Rozema, E.; Verpoorte, R.; Choi, Y.H. Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1434*, 50–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Dai, Y.; van Spronsen, J.; Witkamp, G.J.; Verpoorte, R.; Choi, Y.H. Ionic liquids and deep eutectic solvents in natural products research: Mixtures of solids as extraction solvents. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 2162–2173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Jancheva, M.; Grigorakis, S.; Loupassaki, S.; Makris, D.P. Optimised extraction of antioxidant polyphenols from *Satureja thymbra* using newly designed glycerol-based natural low-transition temperature mixtures (LTTMs). *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* **2017**, *6*, 31–40. [[CrossRef](#)]
45. Dai, Y.; Witkamp, G.J.; Verpoorte, R.; Choi, Y.H. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chem.* **2015**, *187*, 14–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Slim, Z.; Jancheva, M.; Grigorakis, S.; Makris, D.P. Polyphenol extraction from *Origanum dictamnus* using low-transition temperature mixtures composed of glycerol and organic salts: Effect of organic anion carbon chain length. *Chem. Eng. Commun.* **2018**, *205*, 1494–1506. [[CrossRef](#)]
47. Ajila, C.M.; Brar, S.K.; Verma, M.; Tyagi, R.D.; Godbout, S.; Valero, J.R. Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2011**, *31*, 227–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Bi, W.; Tian, M.; Row, K.H. Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1285*, 22–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Fanali, C.; Della Posta, S.; Dugo, L.; Gentili, A.; Mondello, L.; De Gara, L. Choline-chloride and betaine-based deep eutectic solvents for green extraction of nutraceutical compounds from spent coffee ground. *J. Pharm Biomed. Anal.* **2020**, *189*, 113421–113445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Rente, D.; Paiva, A.; Duarte, A.R. The Role of Hydrogen Bond Donor on the Extraction of Phenolic Compounds from Natural Matrices Using Deep Eutectic Systems. *Molecules* **2021**, *26*, 2336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Gironi, F.; Piemonte, V. Temperature and solvent effects on polyphenol extraction process from chestnut tree wood. *Chem. Eng. Res. Des.* **2011**, *89*, 857–862. [[CrossRef](#)]
52. Vergara-Salinas, J.R.; Peérez-Jimeénez, J.; Torres, J.L.; Agosin, E.; Peérez-Correa, J.R. Effects of Temperature and Time on Polyphenolic Content and Antioxidant Activity in the Pressurized Hot Water Extraction of Deodorized Thyme (*Thymus vulgaris*). *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 10920–10929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Bucić-Kojić, A.; Planinić, M.; Tomas, S.; Bilić, M.; Veli, D. Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *J. Food Eng.* **2007**, *81*, 236–242. [[CrossRef](#)]
54. Cacace, J.E.; Mazza, G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *J. Food Eng.* **2003**, *59*, 379–389. [[CrossRef](#)]
55. Pedreschi, F.; Travisany, X.; Reyes, C.; Troncoso, E.; Pedreschi, E. Kinetics of extraction of reducing sugar during blanching of potato slices. *J. Food Eng.* **2009**, *91*, 443–447. [[CrossRef](#)]
56. Ho, C.H.; Cacace, J.E.; Mazza, G. Mass transfer during pressurized low polarity water extraction of lignans from flaxseed meal. *J. Food Eng.* **2008**, *89*, 64–71. [[CrossRef](#)]
57. Kottaras, P.; Koulianos, M.; Makris, D.P. Low-transition temperature mixtures (LTTMs) made of bioorganic molecules: Enhanced extraction of antioxidant phenolics from industrial cereal solid wastes. *Recycling* **2017**, *2*, 3. [[CrossRef](#)]
58. Francisco, M.; van den Bruinhorst, A.; Kroon, M.C. Low-transition-temperature mixtures (LTTMs): A new generation of designer solvents. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 3074–3085. [[CrossRef](#)]
59. Özcan, M.M.; Matthäus, B. A review: Benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Eur. Food Res. Technol.* **2016**, *243*, 89–99. [[CrossRef](#)]
60. Benavente-García, O.; Castillo, J.; Lorente, J.; Ortuño, A.; Del Rio, J.A. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem.* **2000**, *68*, 457–462. [[CrossRef](#)]
61. Karković Marković, A.; Torić, J.; Barbarić, M.; Jokobušić Brala, C. Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health. *Molecules* **2019**, *24*, 2001. [[CrossRef](#)]

62. Dai, Y.; Verpoorte, R.; Choi, Y.H. Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*). *Food Chem.* **2014**, *159*, 116–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Quirantes-Piné, R.; Zurek, G.; Barrajón-Catalán, E.; Bäßmann, C.; Micol, V.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. A metabolite-profiling approach to assess the uptake and metabolism of phenolic compounds from olive leaves in SKBR3 cells by HPLC–ESI–QTOF–MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *72*, 121–126. [[CrossRef](#)]
64. Talhaoui, N.; Taamalli, A.; Gómez-Caravaca, A.M.; Fernández-Gutiérrez, A.; Segura-Carretero, A. Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Int. Food Res.* **2015**, *77*, 92–108. [[CrossRef](#)]
65. Vinha, A.F.; Ferreres, F.; Silva, B.M.; Valentão, P.; Gonçalves, A.; Pereira, J.A.; Oliveira, M.B.; Seabra, R.M.; Andrade, P.B. Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chem.* **2005**, *89*, 561–568. [[CrossRef](#)]
66. Cittan, M.; Çelik, A. Development and Validation of an Analytical Methodology Based on Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry for the Simultaneous Determination of Phenolic Compounds in Olive Leaf Extract. *J. Chromatogr. Sci.* **2018**, *56*, 336–343. [[CrossRef](#)]
67. Ahmad-Qasem, M.H.; Cánovas, J.; Barrajón-Catalán, E.; Micol, V.; Cárcel, J.A.; García-Pérez, J.V. Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2013**, *17*, 120–129. [[CrossRef](#)]
68. Brahmi, F.; Mechri, B.; Dhibi, M.; Hammami, M. Variations in phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Olea europaea* leaves and fruits extracts collected in two different seasons. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *49*, 256–264. [[CrossRef](#)]
69. Ortega-García, F.; Peragón, J. Phenol Metabolism in the Leaves of the Olive Tree (*Olea europaea* L.) cv. *Picual*, *Verdial*, *Arbequina*, and *Frantoio* during Ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 12440–12448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Lee, O.H.; Lee, B.Y.; Lee, J.; Lee, H.B.; Son, J.Y.; Park, C.S.; Shetty, K.; Kim, Y.C. Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 6107–6113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Afaneh, I.; Yateem, H.; Al-Rimawi, F. Effect of Olive Leaves Drying on the Content of Oleuropein. *Am. J. Anal. Chem.* **2015**, *6*, 246–252. [[CrossRef](#)]
72. Yuan, J.J.; Wang, C.Z.; Ye, Z.; Tao, R.; Zhang, Y.S. Enzymatic Hydrolysis of Oleuropein from *Olea europaea* (Olive) Leaf Extract and Antioxidant Activities. *Molecules* **2015**, *20*, 2903–2921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Meirinhos, J.; Silva, B.M.; Valentão, P.; Seabra, R.M.; Pereira, J.A.; Dias, A.; Andrade, P.B.; Ferreres, F. Analysis and quantification of flavonoidic compounds from Portuguese olive (*Olea europaea* L.) leaf cultivars. *Nat. Prod. Res.* **2005**, *19*, 189–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Liakopoulos, G.; Karabourniotis, G. Boron deficiency and concentrations and composition of phenolic compounds in *Olea europaea* leaves: A combined growth chamber and field study. *Tree Physiol.* **2005**, *25*, 307–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Savournin, C.; Baghdikian, B.; Elias, R.; Dargouth-Kesraoui, F.; Boukef, K.; Balansard, G. Rapid High-Performance Liquid Chromatography Analysis for the Quantitative Determination of Oleuropein in *Olea europaea* Leaves. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 618–621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Japón-Luján, R.; Luque-Rodríguez, J.M.; Luque De Castro, M.D. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1108*, 76–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Goulas, V.; Exarchou, V.; Troganis, A.N.; Psomiadou, E.; Fotsis, T.; Briasoulis, E.; Gerothanassis, I.P. Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 600–608. [[CrossRef](#)]
78. Talhaoui, N.; Vezza, T.; Gómez-Caravaca, A.M.; Fernández-Gutiérrez, A.; Gálvez, J.; Segura-Carretero, A. Phenolic compounds and in vitro immunomodulatory properties of three Andalusian olive leaf extracts. *J. Funct. Foods* **2016**, *22*, 270–277. [[CrossRef](#)]

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : Détermination de la teneur en protéines par la méthode de [Lowry et al. \(1951\)](#).

1. Préparations

1. Solution alcaline A - 500 mL de la soude 0.1 N - 10 g de carbonate de sodium anhydre (Na ₂ CO ₃)	2. Solution cuivrique B - 2 mL du CuSO ₄ , 5H ₂ O (0.32 g/ 100ml) - 2 mL du Tartrate double de Na et de K (1 g/100ml)
3. Solution C - 50 mL de la solution A - 1 mL de la solution B	4. Solution de BSA - 0,8 mg de la BSA - 100 mL d'eau distillée

2. Gamme étalon

A partir de la solution de BSA, des dilutions sont préparées suivant le tableau ci-dessous

	1	2	3	4	5	6
Concentration en BSA $\mu\text{g mL}^{-1}$	0	80	200	400	600	800
Solution de BSA (μL)	0	20	50	100	150	200
Eau distillée (μL)	200	180	150	100	50	0

3. Méthode

200 μL d'échantillon sont additionnés au mélange constitué de la solution C (1mL) et du réactif de Folin (100 μL). Une lecture de la DO à 750 nm est réalisée après incubation à l'obscurité pendant 30 min.

4. Expression des résultats

Une courbe étalon est tracée en portant sur l'axe des abscisses, les concentrations en BSA (dilutions préalablement préparées) et sur l'axe des ordonnées, les DO mesurées respectivement pour chaque dilution. La concentration de la protéine inconnue est déterminée en portant la valeur de la DO correspondante sur l'axe des ordonnées qui est ensuite projetée sur l'axe des abscisses.

Annexe 02 : Electrophorèse en conditions non dénaturantes et non dissociantes (PAGE-native)
➤ Préparations

1. Solution d'acrylamide (A) - 36 g d'acrylamide - 1 g de bis-acrylamide - 100 mL d'eau distillée	2. Tampon de gel (B) - 9,1 g de tris - 100 mL Eau distillée Ajuster à un pH 8,9 avec de HCl 4N
3. Tampon d'électrode - 0,12 g de tris - 0,58 g Glycine - 200 mL Eau distillée Ajuster à pH 8,3 avec du Tris	4. Tampon d'échantillon - 100 µL du tampon de gel (B) - 700 µL d'eau distillée - 200 µL du glycérol 50 % - une tête d'aiguille du bleu de Bromophénol

➤ Electrophorèse : Préparation du gel T = 12 % et C = 2,7 %

- 3,25 ml de la solution (A)
 - 5 mL de la solution (B)
 - 1,68 ml d'eau distillée
- Dégazer le mélange pendant 2 mn maximum
- 10 µL TEMED
 - 75 µL de la solution de persulfate d'ammonium 10 %
- Couler et mettre le peigne immédiatement

Dépôt d'échantillon : 10 à 20 µl.

Mise sous tension : 20 mA, 250 V.

Fixation : 45 mn dans la solution de fixation.

Coloration : 1 heure dans la solution de coloration.

Décoloration : dans la solution de décoloration.

Annexe 03 : Electrophorèse en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-SDS)

➤ Préparations

1. Solution d'Acrylamide (A)	
<ul style="list-style-type: none"> - 37,5 g/L d'acrylamide - 1g de bisacrylamide - 100 mL d'eau distillée 	
2. Tampon du gel de séparation (S)	3. Tampon du gel de concentration (C)
<ul style="list-style-type: none"> - 18,15g Tris - 100 mL d'eau distillée Ajuster à pH 8.8 avec HCl 4N	<ul style="list-style-type: none"> - 6g de tris - 100 mL d'eau distillée Ajuster à pH 6.8 avec du HCl 4N
4. Tampon d'électrode	5. Tampon d'échantillon
<ul style="list-style-type: none"> - 3g de tris - 14,4 g de glycine - 1g SDS - 1000 mL d'eau distillée Ajuster à pH 8,3 avec du Tris	<ul style="list-style-type: none"> - 500 µL de la solution (C) - 250 µL d'eau distillée - 250 µL de SDS (10 %) - 50 µL 2-mercaptoéthanol Dissoudre 1 mg de protéines lyophilisées dans 800 µl de ce tampon, ensuite chauffer à 100°C pendant 4 à 5 mn puis refroidir dans un bain d'eau froide. 200 µl d'une solution de glycérol 50 % (v/v) et quelques grains de bleu de bromophénol sont ajoutés à la fin.
6. Solution de persulfate d'ammonium	7. Solution de fixation
<ul style="list-style-type: none"> - 0,1 g de persulfate d'ammonium - 1 mL d'eau distillée 	<ul style="list-style-type: none"> - 12 g de TCA - 100 mL d'eau distillée
8. Solution de coloration	9. Solution de décoloration
<ul style="list-style-type: none"> - 0,5 g du bleu de Coomassie R250 - 4 g TCA - 100 mL de méthanol - 100 mL d'eau distillée 	<ul style="list-style-type: none"> - 37,5 ml d'acide acétique - 312,5 mL d'eau distillée - 150 mL de Méthanol

➤ **Electrophorèse**

1. Préparation du gel de séparation T = 15 % et C = 2,7 %

- 2,85 µL Solution (A)
- 1,87 µL Solution (S)
- 2,65 µL d'eau distillée

Dégazer le mélange pendant 2 mn maximum

- 75 µL de SDS (10 %)
- 11 µL de TEMED
- 80 µL de persulfate d'ammonium (10 %)

Couler à environ 1,5 cm du sommet de la plaque

2. Préparation du gel de concentration : T = 4 % et C = 2,7 %

- 500 µL de la solution (A)
- 1,25 mL de la solution (C)
- 3,2 mL d'eau distillée

Dégazer le mélange pendant 2 mn maximum

- 50 µL de SDS (10 %)
- 11 µL de TEMED
- 50 µL de persulfate d'ammonium (10 %)

Couler immédiatement sur le gel de séparation puis introduire le peigne

Dépôt d'échantillon : 5 à 10 µl.

Mise sous tension : 20 mA, 250 V.

Fixation : 45 mn dans la solution de fixation.

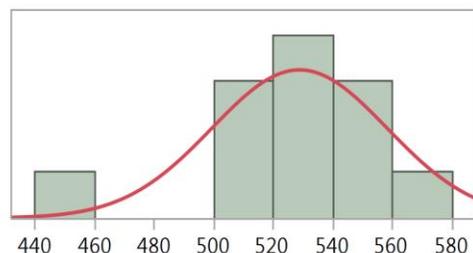
Coloration : 1 heure dans la solution de coloration.

Décoloration : dans la solution de décoloration

Annexe 4 : Distribution des données de la méthode CUPRAC et présentation de quelques paramètres statistiques relatifs à chaque modèle étudié.

Distributions

Pep



— Normal(528.944,29.3483)

Quantiles

100.0%	maximum	575
99.5%		575
97.5%		575
90.0%		569.75
75.0%	quartile	547.625
50.0%	median	530.41667
25.0%	quartile	517.75
10.0%		473.3
2.5%		455
0.5%		455
0.0%	minimum	455

Summary Statistics

Mean	528.94444
Std Dev	29.348338
Std Err Mean	8.4721353
Upper 95% Mean	547.59149
Lower 95% Mean	510.2974
N	12
CV	5.5484726

Fitted Normal

Parameter Estimates

Type	Parameter	Estimate	Lower 95%	Upper 95%
Location	μ	528.94444	510.2974	547.59149
Dispersion	σ	29.348338	20.79022	49.829897

-2log(Likelihood) = 114.156186439076

Goodness-of-Fit Test

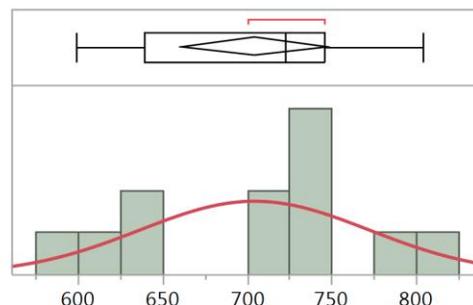
Shapiro-Wilk W Test

W	Prob<W
0.889832	0.1173

Note: Ho = The data is from the Normal distribution. Small p-values reject Ho.

Distributions

chy



— Normal(704.625,67.6186)

Quantiles

100.0%	maximum	804
99.5%		804
97.5%		804
90.0%		798.75
75.0%	quartile	745.375
50.0%	median	722.5
25.0%	quartile	639.125
10.0%		601.4
2.5%		599
0.5%		599
0.0%	minimum	599

Summary Statistics

Mean	704.625
Std Dev	67.618625
Std Err Mean	19.519816
Upper 95% Mean	747.58782
Lower 95% Mean	661.66218
N	12

Fitted Normal

Parameter Estimates

Type	Parameter	Estimate	Lower 95%	Upper 95%
Location	μ	704.625	661.66218	747.58782
Dispersion	σ	67.618625	47.900706	114.80818

-2log(Likelihood) = 134.187727806163

Goodness-of-Fit Test

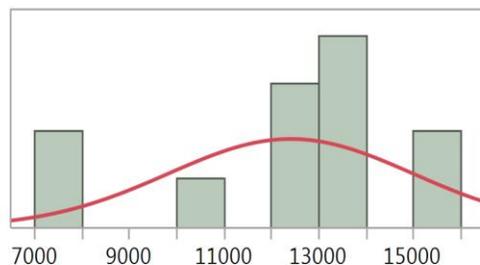
Shapiro-Wilk W Test

W	Prob<W
0.934357	0.4286

Note: Ho = The data is from the Normal distribution. Small p-values reject Ho.

Distributions

Box Cox[try] +1.55



— Normal(12419.7,2583.26)

Quantiles

100.0%	maximum	15850.371283
99.5%		15850.371283
97.5%		15850.371283
90.0%		15674.503097
75.0%	quartile	13632.993064
50.0%	median	13029.892829
25.0%	quartile	11237.530015
10.0%		7503.5333072
2.5%		7344.8120049
0.5%		7344.8120049
0.0%	minimum	7344.8120049

Summary Statistics

Mean	12419.726
Std Dev	2583.2553
Std Err Mean	745.72157
Upper 95% Mean	14061.048
Lower 95% Mean	10778.403
N	12

Fitted Normal

Parameter Estimates

Type	Parameter	Estimate	Lower 95%	Upper 95%
Location	μ	12419.726	10778.403	14061.048
Dispersion	σ	2583.2553	1829.9655	4386.0524

-2log(Likelihood) = 221.617859835925

Goodness-of-Fit Test

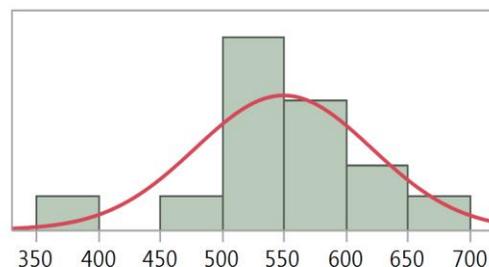
Shapiro-Wilk W Test

W	Prob < W
0.860999	0.0503

Note: Ho = The data is from the Normal distribution. Small p-values reject Ho.

Distributions

Pep_Ch



— Normal(549.933,71.1143)

Quantiles

100.0%	maximum	655
99.5%		655
97.5%		655
90.0%		641.39999998
75.0%	quartile	598.6666667
50.0%	median	548.6666667
25.0%	quartile	532
10.0%		421.8666667
2.5%		363.6666667
0.5%		363.6666667
0.0%	minimum	363.6666667

Summary Statistics

Mean	549.93333
Std Dev	71.114283
Std Err Mean	18.361629
Upper 95% Mean	589.31511
Lower 95% Mean	510.55156
N	15

Fitted Normal

Parameter Estimates

Type	Parameter	Estimate	Lower 95%	Upper 95%
Location	μ	549.93333	510.55156	589.31511
Dispersion	σ	71.114283	52.064657	112.15427

-2log(Likelihood) = 169.496802142512

Goodness-of-Fit Test

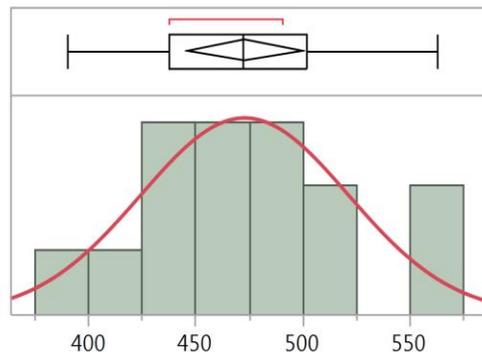
Shapiro-Wilk W Test

W	Prob < W
0.917002	0.1734

Note: Ho = The data is from the Normal distribution. Small p-values reject Ho.

Distributions

Pep_Try



— Normal(473.211,48.5128)

Quantiles

100.0%	maximum	562.6666667
99.5%		562.6666667
97.5%		562.6666667
90.0%		556.2666667
75.0%	quartile	502
50.0%	median	472.3333333
25.0%	quartile	438
10.0%		398.3666667
2.5%		390.6666667
0.5%		390.6666667
0.0%	minimum	390.6666667

Summary Statistics

Mean	473.21111
Std Dev	48.512822
Std Err Mean	12.525957
Upper 95% Mean	500.07662
Lower 95% Mean	446.34561
N	15

Fitted Normal

Parameter Estimates

Type	Parameter	Estimate	Lower 95%	Upper 95%
Location	μ	473.21111	446.34561	500.07662
Dispersion	σ	48.512822	35.517527	76.509524

-2log(Likelihood) = 158.023000130798

Goodness-of-Fit Test

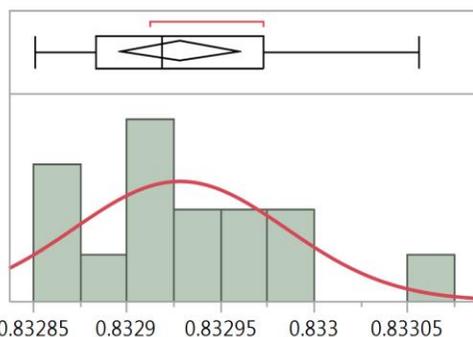
Shapiro-Wilk W Test

W	Prob<W
0.977378	0.9484

Note: Ho = The data is from the Normal distribution. Small p-values reject Ho.

Distributions

Box Cox[Chy-Try]



— Normal(0.83293,5.66e-5)

Quantiles

100.0%	maximum	0.833056417
99.5%		0.833056417
97.5%		0.833056417
90.0%		0.833013504
75.0%	quartile	0.8329728017
50.0%	median	0.8329189149
25.0%	quartile	0.8328838931
10.0%		0.8328533496
2.5%		0.8328512767
0.5%		0.8328512767
0.0%	minimum	0.8328512767

Summary Statistics

Mean	0.8329288
Std Dev	0.0000566
Std Err Mean	1.4614e-5
Upper 95% Mean	0.8329601
Lower 95% Mean	0.8328974
N	15
CV	0.0067951

Fitted Normal

Parameter Estimates

Type	Parameter	Estimate	Lower 95%	Upper 95%
Location	μ	0.8329288	0.8328974	0.8329601
Dispersion	σ	0.0000566	4.1437e-5	8.9261e-5

-2log(Likelihood) = -251.817681988324

Goodness-of-Fit Test

Shapiro-Wilk W Test

W	Prob<W
0.940414	0.3876

Note: Ho = The data is from the Normal distribution. Small p-values reject Ho.