



Université Mohamed Khider de Biskra  
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie  
Département des sciences de la nature et de la vie

Référence ..... / 2021

# MÉMOIRE DE MASTER

Domaine: Sciences de la nature et de la vie  
Filière : Sciences biologiques  
Spécialité : Biochimie Fondamentale et Appliquée

---

Présenté et soutenu par :  
**MEHDA Aya et MAKHLOUFI Nadjeh**

Le: Lundi 28 juin 2021

## **Application de l'huile essentielle de *Citrus limon* pour la conservation de certains produits alimentaires**

---

### Jury :

Mr	<b>LAIADI Ziane</b>	Pr	Université de Biskra	Président
Mme	<b>BENABDALLAH Fatima Zohra</b>	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mr	<b>AGLI Abd Enacere</b>	Pr	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire: 2020 - 2021

# *Remerciements*

*En préambule à ce mémoire nous remerciant ALLAH qui nous aide et nous donne la patience et le courage Jusqu'au bout pour réaliser ce modeste travail.*

*On tient à remercier sincèrement notre encadreur M. BENABDALLAH Fatima Zohra qui a accepté de nous encadrer, pour sa patience et ses conseils précieux et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.*

*A tous les enseignements du Département de Biologie*

*A nos parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience.*

*Enfin, on adresse nos plus sincères remerciements à nos collègues qui nous ont toujours soutenu et encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire.*

*Aya-Nadjah.*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce travail à ceux qui m'ont donné la vie,*

*A mes Parents : Nacer et Rachida Khaled.*

*A mon inspiration, et mon oncle Dr. Mohammed Mehda –  
Qu'Allah lui fasse miséricorde-.*

*A mes Frères : Ahmed, Abdou, Mouhamed et mon précieux  
Yahia.*

*A ma binôme dans ce mémoire Mekhloufi Nadjah et toute sa  
famille.*

*A toutes les familles: Mehda et khaled.*

*A mes amis : Zanoubya, Hafsa, Asma, Nesrine, Mouna, khadija  
et Narimen, Hala, Hadjer, Chadia, Salsabile et Houcine*

*A tous ceux qui m'ont aidé au cours de ma carrière  
académique.*

*Aya*

# *Dédicaces*

*Avant tout je tiens à remercier Dieu le plus puissant pour m'avoir donné la force et la patience afin de réaliser ce modeste travail.*

*Je dédie ce modeste travail*

*A mes très chers parents "Kaddour" et "Saliha" qui m'ont tout donné. Pour leur endurance et leurs sacrifices sans limites qui ont toujours été là pour moi*

*A mes très chère sœurs: Raouia, Imen et Nihed.*

*A toute la famille MAKHLOUFI, GRINI, NADJAA, LOUDINI, BAGHDADI, ABASSI, MIAADI, ABA, SADKI, BEN MARZOUG, BARKET*

*A ma binôme Aya et sa famille.*

*A tous mes amis, Hala, Hadjer, Chadia, Maroua, Salsabil, Nessrine, Dounia, Aicha, Fatiha, Salima, Hana, Zakaria, Mohammed El Bachir, Houcine et toute la promotion Biochimie Appliquée et mes nombreux amis et collègues.*

*Nadjah*

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01:</b> Classement des additifs selon le cadre de la CEE et du Codex alimentarius .....	9
<b>Tableau 02:</b> Les différents échantillons et leurs parties utilisées, récolte et région d'origine et leurs applications sur les aliments .....	14
<b>Tableau 03:</b> Conditions opératoires des analyses en CG/SM .....	16
<b>Tableau 04:</b> Les analyses appliquées sur les aliments incorporés avec les huiles essentielles de <i>Citrus limon</i> . .....	20
<b>Tableau 05:</b> Composition chimique (les monoterpènes) des huiles essentielles du citron extraites analysées par GC/MS .....	26
<b>Tableau 06:</b> Composition chimique (les monoterpènes oxygénés) des huiles essentielles du citron extraites analysées par GC/MS .....	26
<b>Tableau 07:</b> Les résultats d'activité antioxydante des huiles essentielles.....	27
<b>Tableau 08:</b> Les résultats de La sensibilité des souches bactériennes contre HE de <i>Citrus limon</i> . .....	29
<b>Tableau 09:</b> Les résultats de La sensibilité des souches fongiques contre HE de <i>Citrus limon</i> . .....	30
<b>Tableau 10:</b> Les résultats de diamètres des zones d'inhibitions (mm) des huiles essentielles de <i>Citrus limon</i> vis-à-vis les souches testées .....	31
<b>Tableau 11:</b> Caractéristiques physico-chimiques des margarines incorporées à l'HE. ....	31
<b>Tableau 12:</b> Les résultats de test Rancimat. ....	33
<b>Tableau 13:</b> Changement de PH des viandes pendant 10 jours de conservation réfrigérée....	34
<b>Tableau 14:</b> Les valeurs de TBARS de la viande hachée pendant les 10 jours de conservation. ....	36

## Liste des figures

<b>Figure 01:</b> Origine et dispersion des agrumes à travers le monde .....	3
<b>Figure 02:</b> Coupe transversale de fruit de citron .....	5
<b>Figure 03:</b> Parties de plantes permettant la biosynthèse et la sécrétion des huiles essentielles.6	
<b>Figure 04:</b> Schéma explicatif des différents tests et application de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i> .....	13
<b>Figure 05:</b> L'aromatogramme .....	19
<b>Figure 06:</b> Survie en fonction du temps de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19117 à 4 °C après un traitement avec des concentrations croissantes de HES) .....	37
<b>Figure 07:</b> Les concentrations microbiologiques (log CFU/g) pendant la durée de maturation (150j) des sardines salée.....	39
<b>Figure 08:</b> Le taux d'histamine dans les différents échantillons de sardine salée.....	40

## Liste des abréviations

- ABTS+: Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique).
- BHT: Butylated hydroxytoluene.
- °C : Degré celsius.
- CEE : Communauté économique européenne.
- CMB: Concentration minimale bactericide.
- CMF: Concentration minimale fongicide.
- CMI: Concentration minimale inhibitrice.
- CUPRAC: CUPric reducing antioxidant capacity.
- DMSO: Diméthylsulfoxyde.
- DPPH : 2,2 diphényle-1-picrylhydrazyl.
- FTIR : Fourier transform infra red spectroscopy.
- GC/MS : La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
- HE: Huile essentielle.
- Log : Logarithme.
- M: La masse d'échantillon.
- MDA : Malonaldehyde.
- MV : Matières volatiles.
- nm: nanomètre.
- N: La normalité.
- PDA: Potato dextrose agar.
- pH: Le potentiel hydrogène.
- PI : Indice de peroxyde.
- PPM : Partie par million
- SFC: Solid fat content.
- TMC: Total microbial counts
- TPC: Test post-coïtal.
- TPTZ: 2,4,6-tri-(2-pyridyl)-s-triozine.
- UFC: Unité formatrice de colonie

# Sommaire

<i>Liste des tableaux</i> .....	<i>I</i>
<i>Liste des figures</i> .....	<i>II</i>
<i>Liste des abréviations</i> .....	<i>III</i>
<i>Introduction</i> .....	<i>12</i>

## *Bibliographique*

### *Chapitre 1: Revue Bibliographique*15

1. Généralité sur les Rutacées .....	3
1.1. La famille de Rutacée .....	3
1.1.1. Description de la famille Rutacée .....	3
1.1.2. Distribution géographique des agrumes .....	3
1.2. Aperçu général sur le citron ( <i>Citrus limon</i> ).....	4
1.2.1. Description morphologique .....	4
1.2.2. Classification botanique.....	4
1.2.3. Composition de fruit .....	5
2. Généralité sur les huiles essentielles .....	5
2.1. Les huiles essentielles .....	5
2.1.1. Rôle physiologique .....	5
2.1.2. Localisation et lieu de biosynthèse .....	6
2.4. Composition chimique des HE .....	7
2.2. Extraction des huiles essentielles .....	7
2.3. Méthodes de caractérisation des huiles essentielles .....	7
2.3.1. Domaine d'utilisation des huiles essentielles .....	7
2.3.2. Conservation des huiles essentielles .....	8
2.4. Activités biologiques des huiles essentielles .....	8
2.4.1. Activité antioxydant.....	8
2.4.2. Activité antibactérienne .....	8
2.5. Additifs alimentaires.....	9
2.5.1. Définition .....	9
2.5.2. Classification des additifs alimentaires.....	9
2.5.3. Conservateurs.....	10
2.6. Les produits alimentaires .....	11
2.6.1. Les méthodes de conservation des produits alimentaires .....	11

2.6.2. Les facteurs affectant la fraîcheur et la durée de conservation des produits alimentaires .....	11
2.6.3. Des alternatives pour la conservation des aliments .....	11

## ***Partie Experimentale***

### ***Chapitre 2 : Matériel et méthodes***

1. Matériel végétal .....	14
2. Extraction et caractérisation des huiles essentielles .....	14
2.1. Extraction des huiles essentielles .....	14
2.1.1. Extraction par pression à froid .....	14
2.1.2. Extraction par hydro distillation .....	15
2.2. Détermination du rendement en huiles essentielles .....	15
2.3. Caractérisation et identification des huiles essentielles par GC/MS .....	15
3. Détermination de l'activité biologique des huiles essentielles.....	17
3.1. Détermination du pouvoir antioxydant des huiles essentielles .....	17
3.1.1 Blanchissement du $\beta$ -carotène .....	17
3.1.2. Test DPPH .....	17
3.2. Détermination du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles ....	18
3.2.1. Choix et origine des souches .....	19
3.2.2. Mise en culture des souches.....	19
3.2.3. Méthode de diffusion sur disque (aromatogramme).....	19
3.2.4. Méthode de dilution d'agar .....	20
4. Incorporation de l'HE dans les aliments .....	20
4.1. Application des HE de <i>Citrus limon</i> à la margarine.....	21
4.1.1. La production de la margarine et l'addition des HE libres.....	21
4.1.2. Détermination des caractéristiques physico-chimiques .....	21
4.1.3. Évaluation de stabilité oxydative de margarine (test de Rancimat) .....	22
4.2. Application des HE de <i>Citrus Limon</i> à la viande de bœuf hachée ...	23
4.2.1. Préparation de la viande hachée fraîche incorporée avec de l'HE du <i>Citrus limon</i> .....	23
4.2.2. Analyses physico-chimiques.....	23
4.2.3. Évaluation de stabilité oxydative .....	23
4.3. Application des HE de <i>Citrus Limon</i> aux sardines salées .....	23
4.3.1. Préparation des sardines salées et leur incorporation avec les HE .....	23

4.3.2. Analyses sensorielles .....	24
4.3.3. Détermination de taux d’Histamine .....	24
4.3.4. Analyses microbiologiques .....	24
4.4. Application des HE de citrus limon au concentré de tomate .....	24
4.4.1. Application d’HE sur le concentré de tomate .....	24
4.4.2. Analyse microbiologiques .....	24

### **Chapitre 3      Résultats et Discussion**

1. Le rendement et l’apparence externe et caractéristique des HE.....	25
1.1. Le rendement .....	25
1.2. Apparence externe .....	25
1.3. Composition.....	25
2. L’activité biologique.....	27
2.1. Activité antioxydante.....	27
2.1.1. Test de piégeage de radical DPPH.....	27
2.1.2. Test de Blanchissement de $\beta$ - carotène .....	28
2.2. Pouvoir antimicrobien des HE.....	28
3. Incorporation des huiles essentielles dans les produits alimentaires... 31	
3.1. Margarine incorporée .....	31
3.1.1. Caractéristiques physico-chimiques des margarines .....	31
3.1.2. Stabilité oxydative de la margarine .....	33
3.2. Viandes incorporées.....	34
3.2.1. Caractéristiques physico-chimiques des produits alimentaires .....	34
3.2.2.Évaluation de stabilité oxydative TBARS .....	35
3.2.3. Analyses microbiologiques .....	37
3.3 Sardines incorporées .....	38
3.3.1. Analyses microbiologiques .....	38
3.3.2. Analyses sensorielles .....	40
3.4. Concentré de tomate incorporée .....	41
3.4.1. Analyses microbiologiques .....	41
<b>Conclusion.....</b>	<b>42</b>
<b>Références Bibliographique.....</b>	<b>44</b>
<b>Les articles analysés .....</b>	<b>49</b>
<b>Résumé</b>	

# **Introduction**

## Introduction

Les aliments sont exposés à la détérioration par les bactéries, les moisissures et subissent des modifications du goût, de leur couleur et par conséquent la perte de la quantité des nutriments et de la sécurité de ces aliments. En raison de leur efficacité et de leur application facile et pratique, l'utilisation des produits chimiques constitue la technique la plus utilisée pour lutter contre les moisissures nuisibles (Himed, 2020).

L'industrie alimentaire utilise les conservateurs qui sont des substances minérales ou organiques, ajoutées aux aliments dans le but d'améliorer leur conservation. Ils permettent de prolonger la durée de conservation des aliments en les protégeant de l'oxydation et des altérations dues aux micro-organismes présents dans la majorité des produits courants à la consommation, ils empêchent la modification du goût des aliments en garantissant leur innocuité. Cependant, l'utilisation de ces conservateurs alimentaires affecte négativement la santé humaine et parmi ces effets délétères on compte: les allergies ; l'hyperactivité ; l'asthme ; les insomnies ; les troubles digestifs ; les troubles neurologiques ; les rhinites et les atteintes à un organe en particulier comme le foie ou les reins. Certains additifs sont même fortement suspectés d'être mutagènes (Himed, 2014).

De ce fait, nous avons constaté que les conservateurs fabriqués sont dangereux pour la santé humaine car ils contiennent un niveau élevé de toxicité, et il est impératif de rechercher d'autres solutions.

Le problème présenté ici s'interroge sur les produits naturels qui peuvent être utilisés comme conservateurs alimentaires avec un niveau identifiable de toxicité. Dans cette étude, nous essayons autant que possible de synthétiser les informations disponibles relatives à l'utilisation potentielle des huiles essentielles de *Citrus limon* comme agent de conservation.

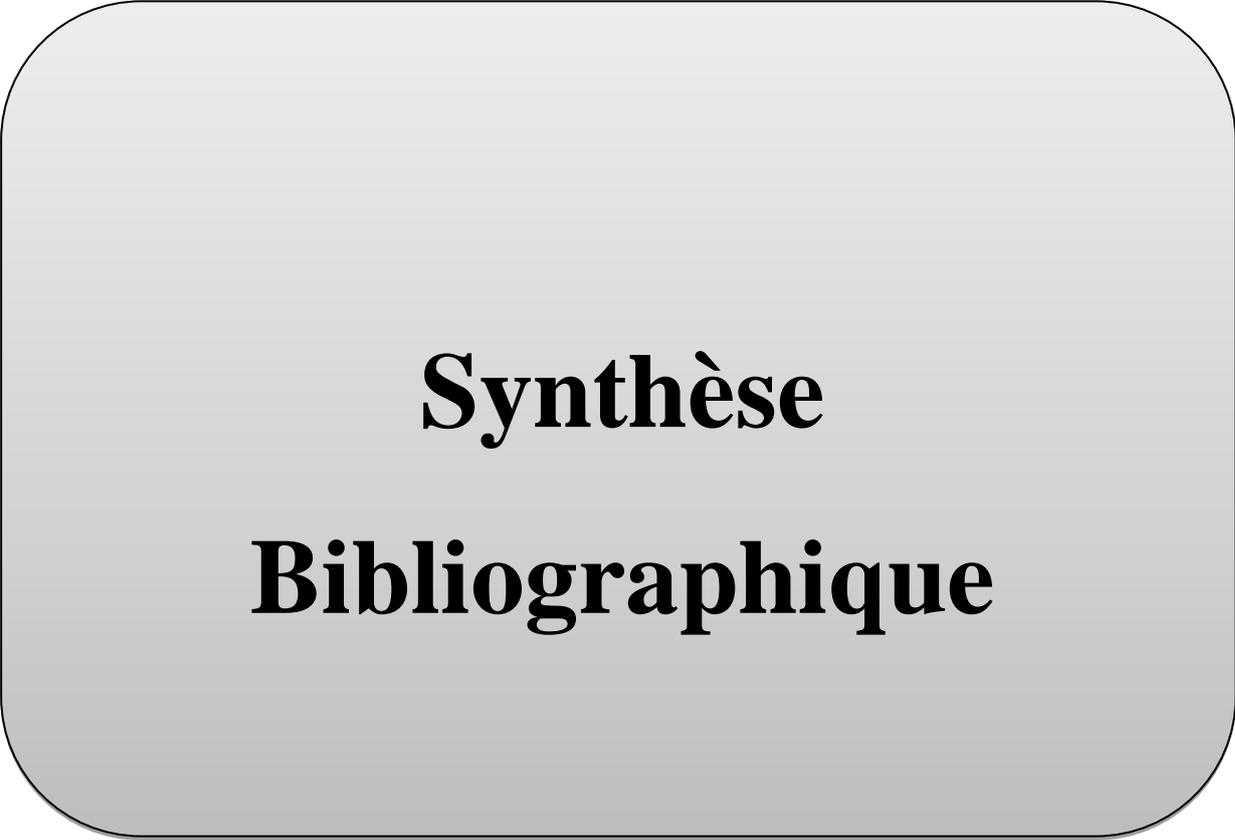
À cause de la situation présente et de la pandémie, des différents tests et essais mentionnés dans ce travail n'étaient pas réalisés pratiquement, le présent travail est une compilation d'études antérieures menées sur l'application de l'huile de *Citrus limon* pour la conservation de certains produits alimentaires, ce travail est présenté comme suit:

La première partie a abordé une étude bibliographique préalable réalisée sur le citron et les huiles essentielles de *Citrus limon*.

La seconde a décrit le matériel et les méthodes utilisés dans notre travail, les résultats expérimentaux trouvés et qui ont été portés sur :

- Le matériel et la méthode utilisée pour l'extraction des huiles essentielles de *Citrus limon* puis l'évaluation de leurs activité biologique en fin leurs incorporation dans certains aliments (concentre de tomate, viande de bœuf hachée, sardines salés et margarines).

- Des études évaluatrices de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de ces huiles essentielles. Suivie par l'élaboration des analyses physicochimiques, microbiologiques et sensorielles après leurs applications sur les différents aliments.



**Synthèse**  
**Bibliographique**

**Chapitre 1**  
**Revue Bibliographique**

## 1. Généralité sur les Rutacées

### 1.1. La famille de Rutacée

#### 1.1.1. Description de la famille Rutacée

Les Rutacées ou bien (*Les Rutaceae*) une famille des plantes d'origine de la Chine, Inde et Indonésie. Cette famille comprend environ 160 genres et 1900 espèces de plantes. Les agrumes appartiennent à cette famille ce sont des angiospermes dicotylédones appartenant à l'ordre des Sapindales sous-famille des *Aurantioideae*, tribu des *Citreae*, sous-tribu des *Citrinae*. Le nom (Agrume) est donné aux arbres appartenant à la famille des Rutacées en plus précise au genre botanique *Citrus.*, donc cette appellation d'origine italienne, désigne les fruits comestibles et par extension les arbres qui les portent. A cette catégorie d'arbre appartiennent les citronniers, les pamplemousses, les orangers, les mandariniers et les cédratiers (Meziane, 2013 ; Kehal, 2013).

#### 1.1.2. Distribution géographique des agrumes

##### 1.1.2.1. Dans le monde

La diffusion des agrumes à travers le monde s'est faite très lentement et bien que l'aire moderne de culture des agrumes soit très vaste, leurs productions proviennent essentiellement des régions méditerranéennes et tropicales, dernièrement les agrumes implantés dans toutes les zones du monde où leur production est possible (figure 01). La localisation précise des pays producteurs forme une ceinture terrestre entre le 40ème parallèle nord et sud (Meziane, 2013).

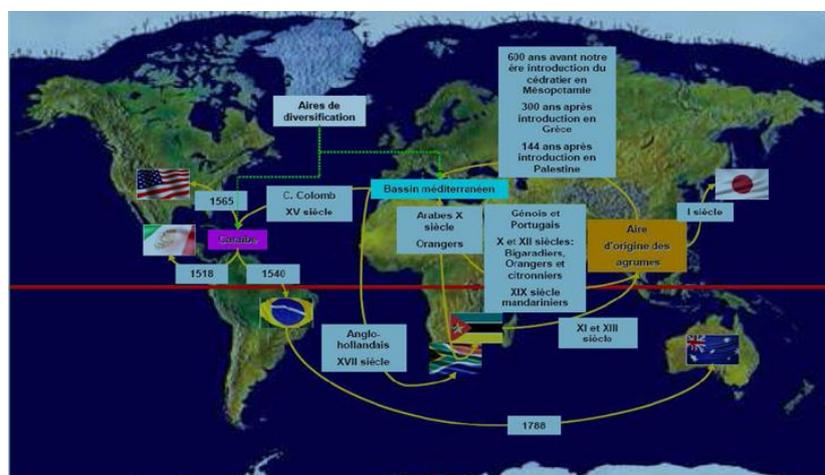


Figure 01: Origine et dispersion des agrumes à travers le monde (Kamiri, 2011)

### 1.1.2.2. En Algérie

L'Algérie a acquis une collection variétale composée de 277 variétés d'espèces agrumes en 2006 (Meziane, 2013). Ces espèces se localisent dans les zones irrigables de la partie Nord du pays ,où elle trouve la température clémente qui assure sa réussite et en raison de son exigence en eau et qualité de sol exactement dans la plaine de la Mitidja qui représente la zone potentielle en agrumiculture, elle couvre une surface de : 36 219 ha (Meziane, 2013).

## 1.2. Aperçu général sur le citron (*Citrus limon*)

### 1.2.1. Description morphologique

Les agrumes sont des arbres d'une hauteur de 3 à 15 mètres. Alors que les citronniers, qui sont des petits arbres, mesurent de 3 à 6 mètres de haut (Kehal, 2013).

Les branches prennent naissance sur le tronc et restent limitées par la taille au nombre de trois ou quatre et porteront les sous-mères, qui porteront à leur tour les rameaux végétatifs et les rameaux fructifères. Les feuilles avec une couleur vert claire sont luisantes, simples ou trifoliées, persistantes, avec une forme variable à bord denticulée. De taille très variable de 5 à 10 cm ; Les fleurs sont blanches, hermaphrodites et possèdent généralement cinq pétales blancs et 20 à 40 étamines entourant (l'ovaire fixé sur un disque nectarifère). Ayant une odeur caractéristique.

### 1.2.2. Classification botanique

*Citrus limon* est une espèce de la famille des Rutacées, connu sous le nom vernaculaire: Le citron. La classification botanique est comme suit (Kehal, 2013) :

**Règne :** *Plantae*.

**Famille :** *Rutaceae*.

**Embranchement :** *Spermaphytes*.

**Sous famille :** *Aurantoideae*.

**Sous embranchement :** *Angiospermes*.

**Tribu :** *Citreae*.

**Classe :** *Eudicotylédones*.

**Sous tribu :** *Citrineae*.

**Sous classe :** *Archichlomydeae*.

**Genre :** *Citrus*.

**Ordre :** *Sapindales*.

**Espèce:** *Citruslimon*.

### 1.2.3. Composition de fruit

Les fruits sont de forme ovale, avec un mamelon plus au moins apparent dans extrémité. Ils sont composés de trois couches concentriques (figure 02).

- Péricarpe contient deux couches : Epicarpe ou bien Flavédo représente la couche externe (zeste) contenant les glandes à des huiles essentielles cette couche doit être colorée en vert, jaune ou orange selon la composition des flavonoïdes, Mésocarpe ou bien Albédo une couche moyenne interne spongieuse de couleur blanchâtre il est constitué de différents segments ou carpelles contenant des poils à jus et des pépins et entourés d'une membrane appelée Septa.

- Endocarpe ou la pulpe, de coloration jaune ou verdâtre. Au milieu de l'Endocarpe se trouve l'axe central du fruit (columelle) qui est entouré par les segments. Ces derniers sont généralement riches en acide citrique car sont composés de vésicules à jus nommés aussi sacs à jus ce qui leur donne leur saveur acide (Kehal, 2013).

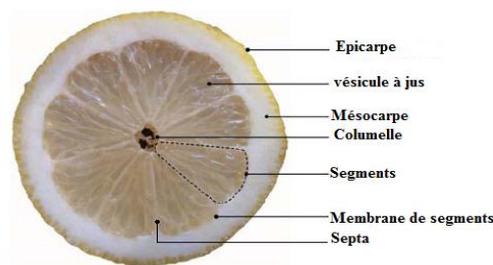


Figure 02: Coupe transversale de fruit de citron (Eristanna et al, 2013)

## 2. Généralité sur les huiles essentielles

### 2.1. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) sont des liquides huileux aromatiques caractérisés par une forte odeur également appelées huiles volatiles ou étherées, limpide et rarement coloré, soluble dans les solvants organiques et insoluble dans l'eau. Ce sont des mélanges naturels très complexes de substances lipophiles, qui peuvent contenir environ 20 à 60 composants à différentes concentrations (Eristanna et *al.*, 2013).

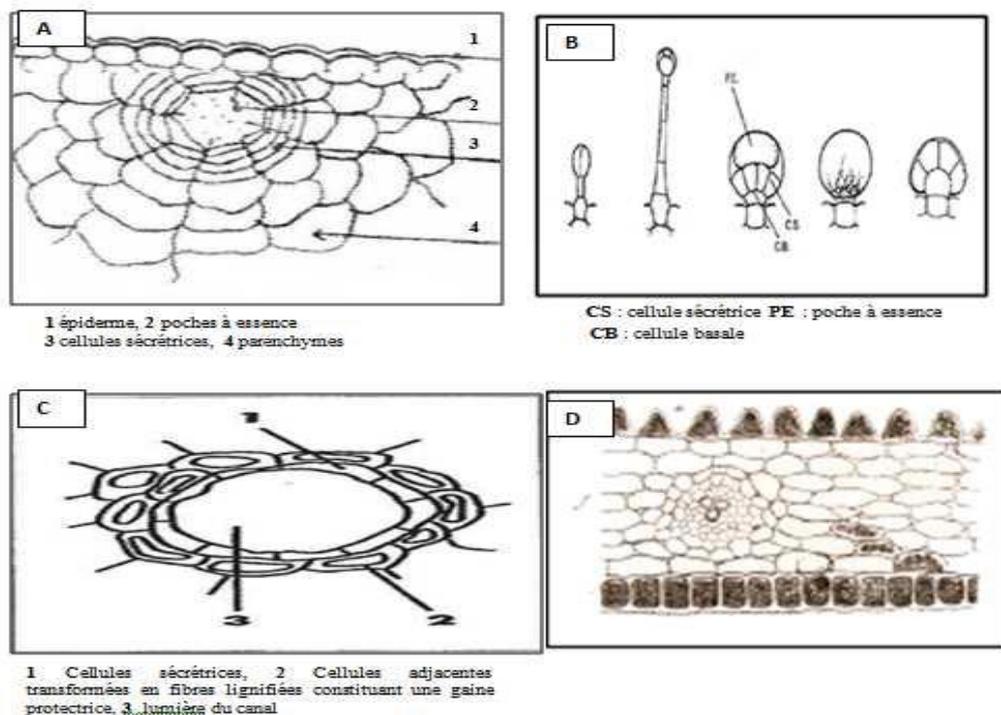
#### 2.1.1. Rôle physiologique

Les HE jouent un rôle important dans la protection des plantes contre les herbivores en

réduisant leur appétit pour ces plantes. Aussi on peut les classées comme des insecticides antibactériens, antiviraux, antifongiques. Ils peuvent également attirer certains insectes pour favoriser la dispersion des pollens et des graines, ou en repousser d'autres indésirables. Ils sont également utilisés comme alternatives aux produits chimiques de synthèse pour protéger l'équilibre écologique (Eristanna *et al.*, 2013).

### 2.1.2. Localisation et lieu de biosynthèse

La synthèse et l'accumulation des HE sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées (figure 03) (Himed et Merniz, 2018). Les glandes sébacées sont des structures sphériques situées juste sous l'épiderme dans les tissus primaires de la pousse (dans les feuilles, épines, prophyllis, sépales, etc.) (Eristanna *et al.*, 2013). En particulier, dans le Flavédo qui représente la couche externe (zeste) contenant les glandes à des HE (Kehal, 2013). Ce dernier est la région pigmentée du Péricarpe, contient de nombreuses glandes sébacées constituées de cavités sécrétoires bordées de plusieurs couches de cellules épithéliales spécialisées (Eristanna *et al.*, 2013).



**Figure 03:** Parties de plantes permettant la biosynthèse et la sécrétion des huiles essentielles (Himed et Merniz, 2018)

A. Poches à essences des Citrus.

B. Différents types de poils sécréteurs chez la sauge officinale.

C. Coupe transversale d'un canal glandulaire schizogène de feuille de *Pinus pinaster*.

D. Cellules à huiles essentielles des Lauracées.

## 2.4. Composition chimique des HE

Les principaux composants des HE d'agrumes sont regroupés en cinq classes, à savoir, les monoterpènes d'hydrocarbures, les monoterpènes oxygénés, sesquiterpènes hydrocarbonés, sesquiterpènes oxygénés. Les groupes les plus importants de composés présents sont les aldéhydes aliphatiques et les mono- et sesquiterpènes contenant de l'oxygène (Mahato et al., 2017).

## 2.2. Extraction des huiles essentielles

Le procédé d'obtention des HE intervient d'une façon déterminante sur sa composition chimique, différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. Parmi ces méthodes on a : la distillation à la vapeur, hydro diffusion, l'enfleurage, extraction par les solvants organiques, l'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique, pression à froid, extraction par hydro-distillation et distillation à micro-ondes.

## 2.3. Méthodes de caractérisation des huiles essentielles

### 2.3.1. Domaine d'utilisation des huiles essentielles

Les HE sont largement utilisés dans des nombreuses applications depuis longtemps. Ces dernières années, ils ont été utilisés dans différents domaines telles que:

- Le domaine cosmétique fabrication des crèmes, des parfums, les gels, savonnerie et soins pour le corps ou le visage.

- La santé (pharmacie et aromathérapie) fabrication des produits à base d'huiles essentielles tels que les pommades et certains médicaments.

- L'agriculture, l'utilisation des HE comme des pesticides et insecticides contre les insectes et les ravageurs.

- L'industrie agroalimentaire, les HE sont utilisées comme des agents conservatives, aromatisants et épices alimentaires pour les boissons gazeuses ou alcooliques, les condiments, les confiseries, les produits laitiers, les produits carnés, les produits de boulangerie et aussi l'emballage antimicrobien des produits alimentaires; films minces comestibles; nanoémulsions pour la conservation de légumes et de fruits. Grâce aux effets antimicrobiens

et antioxydants de certains de leurs constituants. Ces agents naturels viennent remplacer ou réduire les agents de conservation chimiques ou synthétiques qui présentent des effets néfastes sur la santé (Mahato et *al.*, 2017).

### **2.3.2. Conservation des huiles essentielles**

La conservation des HE est difficile, car ils sont des substances fragiles et volatiles. Elles doivent être conservées dans des flacons hermétiquement fermés et colorés, à lumière et variations de température. Ces instructions doivent être respectées pour s'assurer que les huiles sont bien conservées pendant longtemps (jusqu'à 2 à 5 ans).

## **2.4. Activités biologiques des huiles essentielles**

L'activité biologique est l'évaluation des effets antioxydants, antibactériens, activités antivirales, insecticides, fongicides, anti-inflammatoires, anti-brûlures et cicatrisante par l'application des différents tests sur l'extrait de l'huile essentielle. Pour l'évaluation de ces tests sur l'incorporation de l'huile essentielle de *Citrus limon* dans les aliments on détermine le pouvoir antioxydant et antibactérien :

### **2.4.1. Activité antioxydant**

Les antioxydants définis comme étant des composés ont le pouvoir de minimiser efficacement les rancissements, ils augmentent la durée de conservation du produit et assure le maintien de la qualité, ils aident à retarder la peroxydation lipidique du produit alimentaire, sans effet sur les propriétés sensorielles et nutritionnelles. La détermination de l'efficacité de ces composés se fait par les tests suivants: Blanchissement du  $\beta$ -carotène, Piégeage des radicaux, pouvoir réducteur et Pouvoir chélateur du fer (Kehal, 2013).

### **2.4.2. Activité antibactérienne**

Les antibactériens sont des composés capables de détruire les microorganismes ou empêcher leur croissance, y compris les antibiotiques et autres agents antifongiques et antibactériens. La détermination de l'efficacité de ces composés se fait par les tests suivantes : choix et origine des souches, mise en culture des souches et préparation des disques, méthode de diffusion sur disque (aromatogramme), méthode de dilution d'agar (Kehal, 2013). Il a été rapporté que les HE de *Citrus limon* possèdent des activités antibactériennes contre *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *L. monocytogenes* et *Vibrio vulnificus* et contre *S. typhimurium* (Eristanna et *al.*, 2013).

## 2.5. Additifs alimentaires

### 2.5.1. Définition

Les additifs alimentaires sont des ingrédients fonctionnels indispensables des aliments modernes. L'additif confère alors un meilleur aspect, un meilleur goût et une plus grande praticité, une de ces caractérisations doit être utilisée à dose entrainement précise (Reynal et Multon, 2009). Il est nécessaire de trouver la concentration efficace la plus faible avec moins d'effet sur les attributs sensoriels ou de tester si la phase vapeur générée par les HE peut être efficace contre les agents pathogènes d'origine alimentaire et les microorganismes d'altération à des concentrations plus faibles que lorsqu'elle est appliquée en phase liquide (Eristanna et al., 2013).

### 2.5.2. Classification des additifs alimentaires

Les additifs alimentaires sont classés dans des catégories (environ 21 catégories fonctionnelles) selon ces différentes fonctionnelles en considérant les propriétés principales d'utilisation (tableau 01). Ces derniers sont classés dans un ordre numérique, avec le numéro attribué à chaque substance (environ 450) et l'indication de la fonction technologique de celle-ci (Kehal, 2013).

**Tableau 01:** Classement des additifs selon le cadre de la CEE et du Codex alimentarius (Kehal, 2013)

Classement des additifs selon le cadre de la CEE	Classement des additifs selon le cadre du Codex alimentarius
1. Colorant	1. Correcteur d'acidité et du pH (tampon),
2. Conservateur	2. Antiagglomérant (desséchant, antiadhérant),
3. Antioxygène	3. Antimoussant,
4. Emulsifiant	4. Antioxygène (et synergiste d'antioxydation),
5. Sel de fonte	5. Agent de charge,
6. Epaississant	6. Edulcorant,
7. Gélifiant	7. Colorant (et adjuvants de coloration),
8. Stabilisant	8. Stabilisateur de couleur,
9. Exhausteur de goût	9. Emulsifiant (plastifiant, dispersant, surfactif),

10. Acidifiant	10. Sel de fonte (émulsifiant pour fromage),
11. Correcteur d'acidité (et de pH)	11. Exhausteur de goût,
12. Antiagglomérant	12. Agent de traitement de farine (conditionneur de pâte),
13. Amidon modifié	13. Gélifiant,
14. Edulcorant	14. Agent de glisse (d'enrobage, lustrage, vernissage),
15. Poudre à lever	15. Conservateur (antimicrobien),
16. Antimoussant	16. Gaz propulseur (et gaz pour le stockage, emballage),
17. Agent d'enrobage (et de glisse)	17. Stabilisant (liant, séquestrant, ajusteur de densité),
18. Agent de traitement de la farine	18. Épaississant (agent de texture, gonflant),
19. Affermissant	19. Poudre à lever,
20. Humectant	20. Agent moussant
21. Séquestrant	21. Humectant (mouillant, rétenteur d'humidité)
22. Enzyme	
23. Agent de charge	
24. Gaz propulseur et gaz d'emballage	

CEE : Communauté Economique Européenne.

### 2.5.3. Conservateurs

L'industrie alimentaire dispose d'une vaste gamme de procédés naturels de conservation. Les huiles essentielles sont actuellement étudiées pour mieux cerner leurs efficacités comme conservateurs naturels à cause de ces composés constitutifs empêchent la multiplication, la synthèse des toxines et la sporulation des bactéries. Sur les moisissures, ils inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la toxinogénèse et pour les levures, ils agissent sur la biomasse et la production de pseudo-mycélium (Kehal, 2013).

#### 2.5.3.1. Agents conservateurs

Les additifs conservateurs alimentaires sont définis comme étant des substances qui ne

sont pas consommées tant qu'elles ne sont pas combinées avec des aliments sont capables d'inhiber les contaminants. Il existe deux types de conservateurs, minéraux (les chlorures et les phosphates, les nitrates, les nitrites, les anhydres sulfureux et les sulfites, les anhydres carboniques et les bicarbonates et le peroxyde d'hydrogène) et organiques (acide acétique, propionique, formique, sorbique, benzoïque, acide citrique, tartrique, lactique et ascorbique) (Kehal, 2013).

### **2.5.3.2. Agents antioxydants**

La lutte contre l'oxydation des lipides représente un enjeu considérable pour les industriels alimentaires. L'oxydation peut résulter de plusieurs voies, soit par la photo-oxxydation, soit par l'auto-oxxydation catalysée par la température, soit par l'oxxydation enzymatique. Pour ralentir ou supprimer l'oxxydation de ces dernières, deux voies sont envisageables: tenter de réduire les facteurs favorables à cette oxxydation et/ou trouver un réactif qui ralentit l'oxxydation : c'est le rôle de l'antioxydant (Kehal, 2013).

## **2.6. Les produits alimentaires**

### **2.6.1. Les méthodes de conservation des produits alimentaires**

Il existe plusieurs modes de conservation des aliments comme : la conservation dans l'alcool, dans le sel, le fumage, la conservation en milieu acide, dans le sucre, dans la graisse et la conservation dans de l'huile. L'utilisation de dernière méthode (conservation dans les huiles) par l'addition des substances intentionnelle aux produits alimentaire dans un but technologique ou organoleptique pendant les étapes de fabrication, transformation, d'emballage, de transport ou de stockage de là dite denrée de traitement (Kehal, 2013).

### **2.6.2. Les facteurs affectant la fraîcheur et la durée de conservation des produits alimentaires**

L'altération peut toucher le produit dans n'importe quelle partie. Cette altération peut être due à l'oxygène de l'aire, humidité, la température, la lumière, ou traces de métaux ou à certaines enzymes, aussi les micro-organismes naturellement présents dans ou sur l'aliment. Tous ces facteurs là provoquent et affectant la fraîcheur et la durée de conservation des produits alimentaires (Kehal, 2013).

### **2.6.3. Des alternatives pour la conservation des aliments**

Permis les méthodes alternatives de conservation des aliments :

- Les additifs alimentaires naturels (comme les HE) sont des produits ajoutés aux denrées alimentaires. Ils doivent être portés sur l'emballage dans la liste des ingrédients. Ces agents conservatifs choisis par les industriels doivent avoir été préalablement autorisés. Certaines conditions doivent être respectées pour garantir l'authenticité des aliments à conserver, ils peuvent enfin avoir une valeur nutritionnelle.

- L'irradiation c'est-à-dire l'exposition, volontaire ou accidentelle, d'un corps, d'un organisme ou une substance, à des rayonnements. Cette méthode pratiquée depuis un bon nombre des années, pour détruire les insectes et les microorganismes dans les fruits et les légumes. Ce procédé a par ailleurs pour effet d'inhiber la germination, ralentir le mûrissement et, mieux, donner aux aliments une apparence de fraîcheur (Ben Hsouna et *al.*, 2017).



**Partie  
Experimentale**

# **Chapitre 2**

## **Matériel et méthodes**

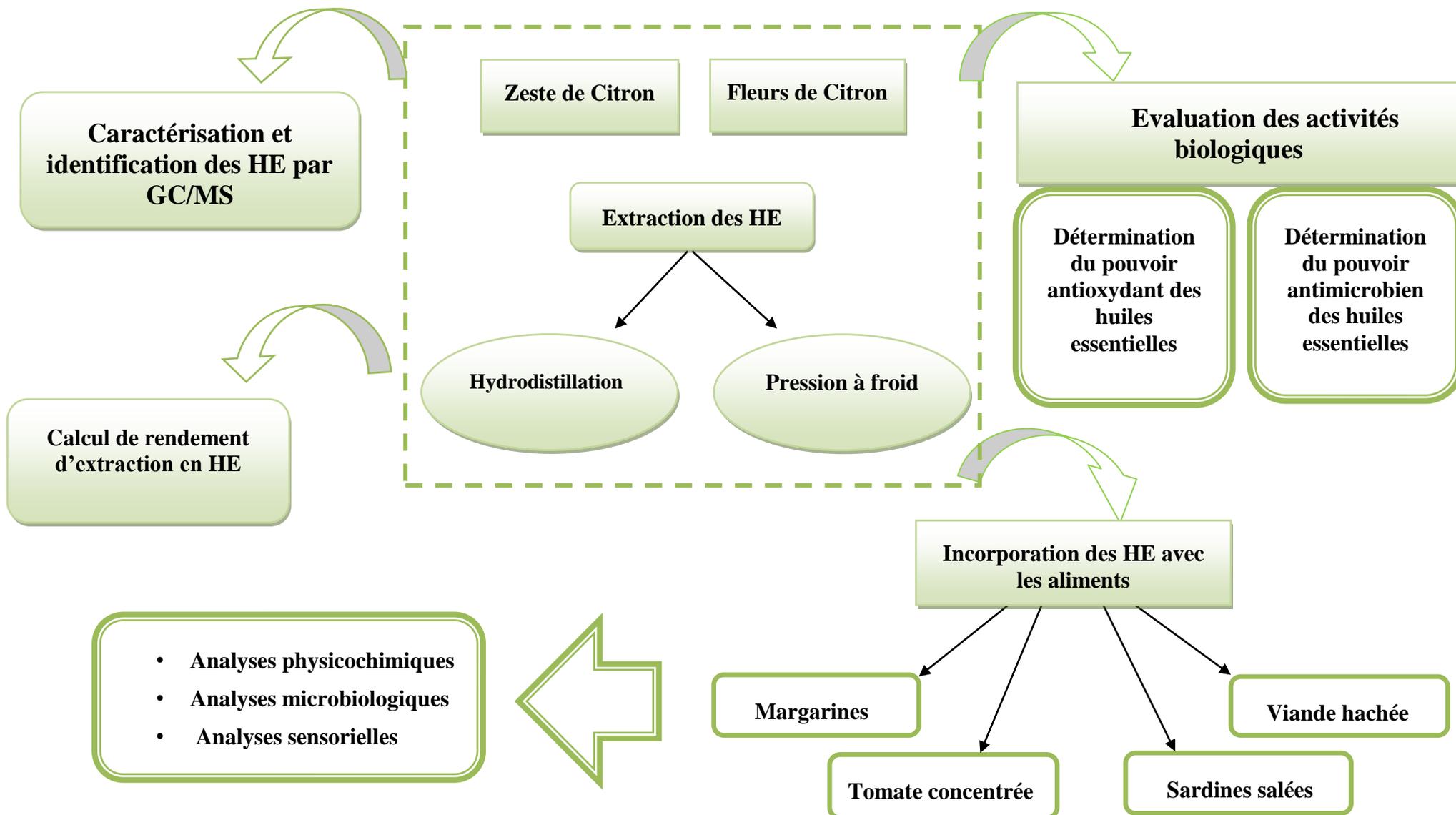


Figure 4: Schéma explicatif des différents tests et application de l'huile essentielle de Citrus limon

## 1. Matériel végétal

Les huiles essentielles dans ce travail ont été extraites à partir de zeste de citron. Un seul échantillon a été extrait à partir des fleurs (Ben Hsouna et *al.*, 2017).

**Tableau 02:** Les différents échantillons et leurs parties utilisées, récolte et région d'origine et leurs applications sur les aliments

Variétés	Partie utilisé	Date de Récolte	Région d'origine	L'application des huiles essentielles sur	References
<i>Lisbon</i>	Zeste	NM	Béjaia (Algérie)	Margarine	(Himed et <i>al.</i> , 2016)
<i>Euréka</i>	Zeste	NM	Algérie	Tomate concentré	(Himed et <i>al.</i> , 2020)
<i>FemminelloSiracusano2Kr</i>	Zeste	NM	Sicile (Italie)	Sardines salées	(Alfonzo et <i>al.</i> , 2016)
NM	Fleurs	Avril 2015	Nabeul (Tunisie)	Viande hachée	(Ben Hsouna et <i>al.</i> , 2017)

NM : non mentionné.

Après la récolte, les fruits ont été lavés et essuyés par un chiffon propre, afin d'être prêts à l'extraction des huiles essentielles (tableau 02).

## 2. Extraction et caractérisation des huiles essentielles

Dans cette étude 04 échantillons ont été extraits dans différents laboratoires par deux méthodes d'extraction essentielles (pression à froid et hydro distillation).

### 2.1. Extraction des huiles essentielles

#### 2.1.1. Extraction par pression à froid :

Les huiles essentielles ont été extraites à partir de 10 kg de citron à l'aide d'une râpe et sous un filet d'eau. L'écorce râpée de citron stimule les huiles à sortir, puis vont sortir et vont

être collectés avec de l'eau. La séparation de ces deux se fait par décantation, la déshydratation ensuite se fait par le sulfate de sodium anhydre et leur conservation à 4°C à l'abri de la lumière (Himed et Merniz, 2018).

### 2.1.2. Extraction par hydro distillation :

#### - De frais zestes

Une quantité de 100 g de zeste a été versé dans un chauffe-ballon de 2L, exposée à la vapeur, cette dernière va être chargée par les molécules volatiles dans le zeste et enfin va être condensé à l'aide d'un réfrigérateur, pour qu'on obtient (après 3h) une solution de deux phases, dans une ampoule à décantée. La phase organique est celle qui contient les huiles essentielles, et cette dernière va être traitée avec du sulfate de sodium anhydre pour éliminer les traces d'eau. On note que cette extraction a été effectuée à l'aide d'une appareil de type Clevenger. Conservé à -20°C à l'abri de la lumière jusqu'à les analysés (Bourgou et *al.*, 2012).

#### - Des fleurs

Une quantité de 1 kg des fleurs frais, à l'aide d'une appareil de type Clevenger pendant 3 h. La phase aqueuse est isolée par dichlorométhane et traitée avec du sulfate de sodium anhydre pour éliminer les traces d'eau. Après la filtration le solvant est éliminé par distillation sous pression et l'huile pure est condensée dans le rota vapeur, conservé à 4°C à l'abri de la lumière (Ben Hsouna et *al.*, 2017).

## 2.2. Détermination du rendement en huiles essentielles :

Les différents échantillons ont différents rendements et pour calculer le rendement des huiles essentielles de chaque échantillon on a l'équation suivante (Chanthaphon et *al.*, 2008)

$$\text{Rendement(\%)} = \frac{\text{la masse de l'extrait récupéré}}{\text{la masse d'échantillon (zest ou fleurs)}} \times 100.$$

## 2.3. Caractérisation et identification des huiles essentielles par GC/MS :

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS); est une technique analytique qui s'intéresse à la séparation des molécules de petite poids moléculaire (Chen, 1992). Les conditions de la GC/MS sont bien identifier dans le (tableau 03).

**Tableau 03:** Conditions opératoires des analyses en CG/SM (Merniz et Himed, 2018)

<b>Paramètres</b>	<b>Chiffres</b>
Mode de détection	Impact électronique
Courant d'ionisation	70 eV
Colonne capillaire	DB-5
Longueur	30m
Diamètre interne	0,25mm
Epaisseur de phase	0,25µm
Gaz vecteur	Hélium
Débit	3ml/min
Pression (source, analyseur)	10 <sup>-7</sup> mbar
Température d'interface	280°C
Température de l'injecteur	250°C 8 min à 60°C
Programme du four	2°C/min de 60°C à 280°C 15 min à 280°C
Concentration des échantillons	Pur
Quantité injectée	0,2µl
Mode d'injection	Split 1:20

L'identification des constituants a été effectuée par comparaison des indices de rétentions et des spectres de masse (ions-fragments) obtenus expérimentalement par rapport à ceux cités dans la littérature et/ou inventoriés dans les banques de librairies spectrales (Wiley/NBS) (Bourgou et *al.*, 2012).

### 3. Détermination de l'activité biologique des huiles essentielles

L'activité antioxydante des huiles essentielles a été évaluée à l'aide des méthodes suivantes : le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène et la mesure de l'activité de Piégeage d'un radical libre puissant DPPH (2,2 diphényle-1-picrylhydrazyl).

#### 3.1. Détermination du pouvoir antioxydant des huiles essentielles

##### 3.1.1 Blanchissement du $\beta$ -carotène:

Ce test a été réalisé en suivant la méthode de Juntachote et Berghofer (2005); dans 20ml de chloroforme, ils ont dissous 2 mg de  $\beta$ -carotène, et ont pris 3 ml de cette solution et ont l'introduit dans un ballon avec 40mg d'acide linoléique et 400 mg Tween 20. Après ils ont les mettre dans le rota vapeur pour 5 min à 50°C pour l'évaporation de chloroforme, après ils ont ajouté 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène avec agitation. Ils ont pris 3ml de cette nouvelle solution avec 120 $\mu$ l de la solution d'huile essentielle du *Citrus limon* à une concentration de 0,004g/ml d'éthanol dans un tube à essai.

Le contrôle positif pour l'huile essentielle est un antioxydant naturel lipophile (l' $\alpha$ -tocophérol), dans le contrôle négatif par l'éthanol. L'étalon par une solution ne contient pas de  $\beta$ -carotène et sans antioxydant (huile essentielle).

Ils ont placé les tubes dans un bain marie à 50°C, surveillée par spectrophotométrie à 470 nm chaque 20 min pendant 120 min (Mayachiew & Devahastin, 2008).

$$AA \% = [1 - (AE0 - AEt)/(AC0 - ACt)] \times 100$$

Où :

**AA (%)** : Activité antioxydant ;

**AE0** : valeur de l'absorbance de l'émulsion en présence de l'huile essentielle mesurée à t=0 ;

**AC0**: valeur de l'absorbance de l'émulsion du contrôle négatif mesurée à t=0 ;

**AEt** : valeur de l'absorbance de l'émulsion en présence de l'huile essentielle mesurée à t=120 mn ;

**ACt** : valeur de l'absorbance de l'émulsion du contrôle négatif mesurée à t=120 mn.

##### 3.1.2. Test DPPH:

Le DPPH° (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur

violacée. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH° est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH°, qui est proportionnel au pouvoir anti-radicalaire de l'échantillon (Kehal, 2013).

Différentes dilutions ont été préparées, ils ont pris 25 ul de l'échantillon diluée et les ajouté à un volume de 975ul d'une solution de DPPH a des concentrations variables [6 \_ 105 M] et les mélangée à l'aide d'un vortex. La diminution d'absorbance a été déterminé à 515 nm quand la réaction atteint le plateau à l'aide d'un HP 8452A spectrophotomètre à barrette de diodes dans une cuvette en quartz (10mm).ils ont utilisé le méthanol pour calibrer la machine de test, après l'absorbance de DPPH radical sans échantillon a été mesurée. La concentration de DPPH dans le milieu de réaction a été calculée à partir de la courbe, déterminée par régression linéaire :

$$A_{515 \text{ nm}} = 0.0262 \times [\text{DPPH } (\mu\text{g/ml})] + 0.0068 \text{ (R}^2 = 0.999)$$

$$\text{Le pourcentage de DPPH resté dans la phase stable\%} = [\text{DPPH}]_{t=T} / [\text{DPPH}]_{t=0}$$

T: est le temps nécessaire pour atteindre la phase stable.

Le ratio [phénolique] (μg)/[DPPH] (μg) a été tracé contre le % de DPPH restant pour obtenir le montant d'échantillon nécessaire pour diminuer la concentration initiale de DPPH de 50 % (EC<sub>50</sub>) L'efficacité anti radicalaire (AE) est calculée comme suit (Mansouri et *al.*, 2005):

$$AE = 1 / (EC_{50}).$$

### 3.2. Détermination du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE testée a été réalisée par deux méthodes : la méthode des aromatogrammes pour tester la sensibilité et la méthode de dilution d'agar pour déterminer les valeurs des paramètres antimicrobiens dont la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) ou fongicide (CMF).

### 3.2.1. Choix et origine des souches :

L'activité antimicrobienne des HE a été évaluée sur beaucoup des souches de contamination alimentaire, fournies par des laboratoires (des souches bactériennes de GRAM positive, de GRAM négatif, et des souches fongiques).

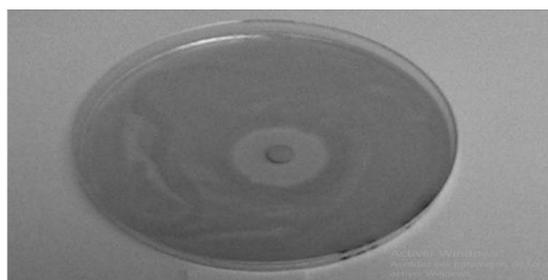
### 3.2.2. Mise en culture des souches :

Pour le but de l'obtention d'une phase exponentielle croissante, une pré-culture a été préparé ; les souches sont mettre avec un bouillant nutritive dans des tubes et incubée à 37°C pendant 24 h, pour les souches fongiques un milieu PDA (Potato Dextrose Agar) et incubée à 30°C pendant 3 à 7 jours. La préparation d'inoculum a été faite à partir de ces tubes par le prélèvement des colonies bien isolés et bien identiques, mises dans 5 ml de l'eau physiologique stérile à 0,9% de sel, après leur homogénéisation à l'aide d'un vortex leur densité optique doit être lue à 625 nm (0,08 à 0,10). Après l'ajustement de l'inoculum, L'ensemencement doit se faire en moins de 15 min après la préparation de l'inoculum. Pour les moisissures les suspension sont préparées à partir d'une culture de 7 jours dans le stade de sporulation dans un milieu PDA et ajustées à 10<sup>6</sup> spores/ml (Merniz et Himed, 2018).

### 3.2.3. Méthode de diffusion sur disque (aromatogramme) :

L'aromatogramme est une méthode qui permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance microbienne des huiles essentielles par la mesure d'inhibition autour d'un disque de cellulose imprégné d'huile essentielle (figure 05). La suspension de chaque germe (100µl) est étalée sur une boite pétrie de 90 mm. Les boites ont été mises sous hotte à flux laminaire (le couvercle légèrement ouvert) pour que la surface être séchée, ensuite des disques de papier buvard de 6mm stériles sont déposés sur la gélose (un disque par boite), ils sont imprégnés d'HE. La lecture des résultats se fait après 48 h d'incubation à une étuve à 30°C. La sensibilité est classée par le diamètre des halos d'inhibition.

Les souches montrant une sensibilité aux HE ont été sélectionnées pour déterminer les valeurs des paramètres antimicrobiens par la méthode de dilution d'agar (Billerbeck, 2007).



**Figure 5:** L'aromatogramme. (Billerbeck, 2007)

### 3.2.4. Méthode de dilution d'agar :

Pour la détermination des CMI, CMB et CMF ; ils ont utilisé la méthode d'agar approuvé par NCCLS (National Committee for Clinic Laboratory Standards), avec des modifications. Une quantité de 0.5% (v/v) de tween 20 avec un volume de 20 ml de gélose fondue ont été mis dans des tubes à essai.

Différentes concentrations d'HE qui ont été préparé dans DMSO (Diméthylsulfoxyde) (50µl/ml - 1000µl/ml) ont été additionné, le mélange a été coulé dans des boites pétri, et après leur solidification 1µl ( $10^5$  unité de formation des colonies) de souches microbiennes a été mis dans les boites contenant le milieu Mueller Hinton (gélose) pour les bactéries et le milieu sabouraud pour les moisissures. Contrôles positifs (0.5%(v/v) avec de tween 20, sans huiles essentielles). Les boites de pétri ont été incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et à 30°C pendant 72 heures pour les moisissures (Hammer et *al.*, 1999).

## 4. Incorporation de l'HE dans les aliments

**Tableau 04:** Les analyses appliquées sur les aliments incorporés avec les huiles essentielles de Citrus limon.

	Analyses physico-chimique			Analyses de stabilité oxidative		Analyses sensorielle	Analyses microbienne	Autres analyses
	TM V	pH	SFD	Test de Rancimat	Test de TBARS			
<b>Margarine incorporée</b>	✓	✓	✓	✓				L'indice de peroxyde, point de fusion.
<b>Viande hachée incorporée</b>		✓			✓			

<b>Concentre de tomate incorporée</b>						✓	✓	
<b>Sardines salées incorporée</b>						✓	✓	Taux d'Histamine.

TMV : Teneur en eau et en matières volatiles. SFD : Solide fat content ✓ : Mentionnée

#### 4.1. Application des HE de *Citrus limon* à la margarine:

##### 4.1.1. La production de la margarine et l'addition des HE libres:

Produits à une échelle pilote, deux phases 82% graisse et 18% liquide. Les ingrédients de la phase des grasses sont l'huile de palmier, huile de tournesol, huile de corah hydrogéné, huile de palme hydrogénée et Tocoblend (l'agent antioxydant utilisée dans les margarines ) ou HE (100ppm), la phase liquide a été constituée de 16% d'eau, b-carotène (7ppm) arôme (0.8g/kg), sel (0.3%), acide lactique (0.5g/kg) et sorbate de potassium (1.3g/kg).

La phase lipidique a été fondu à 70°C dans un réservoir avec un agitateur, après l'addition d'émulsifiant qui a été dissout dans une petite quantité de graisse. L'addition de la phase aqueuse (qui a été préparée d'avance dans un autre récipient) après l'agitation pour au moins 10 min pour l'obtention d'une pré-émulsion bien homogénéisée. La margarine a été traité a l'aide d'un usine pilote perfecteur simplifié fabriquée d'un tube refroidisseur suivi par un tube de repos.

La margarine produite a été conservé dans des barquettes en plastique de 250 g après la stabilisation de la température, et stockées au réfrigérateur à une température de 4°C (Himed et al., 2016).

##### 4.1.2. Determination des caractéristiques phisyo-chimiques:

Teneurs en eau et en matières volatiles: selon la méthode de (Wolff, 1968); dans une capsule ils ont mis 20g de sable purifié avec 5g de margarine, ensuivent ils ont mis cette capsule dans une étuve réglée à  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 30 min. Après refroidissement la capsule été pesée, ces operations (séchage, refroidissement et pesée) ont été répétés jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

pH: Le pH a été déterminé directement sur la phase aqueuse, après sa séparation du produit, à l'aide d'un pH-mètre (AFNOR., 1982).

Détermination du peroxyde: L'indice de peroxyde (PI) est la quantité du produit présente dans l'échantillon exprimée en  $\mu\text{g}$  d' $\text{O}_2$  actif par 1000g du corps gras dans les conditions opératoires décrites. Pour cela ils ont mélangé 5g de margarine fondue avec 12ml de chloroforme, 18 ml d'acide acétique et 0.5 ml de solution d'iodide de potassium. Après 1 min, ils ont ajoutés des gouttes de l'indicateur colorée l'amidon avec 75 ml de l'eau distillée .après le mélange a été titré avec solution de sodium thiosulfate de sodium (0.01N) jusqu'à changement de couleur en jaune pâle. Le blanc a été dans les mêmes conditions. Les résultats sont obtenus par l'équation suivante:

$$\text{PI} = (\text{V/M}) \times 1000$$

**M**: la masse d'échantillon (g) (ISO, 1998).

**PI** : indice de peroxyde

**V**: volume thiosulfate de sodium (ml).

Détermination de point de fusion: les tubes capillaires ont été placés dans de l'eau froide puis chauffés jusqu'à ce que le niveau de la matière grasse se lève dans le tube capillaire. C'est là la température de fusion. (ISO, 2002)

Détermination de contenu solide (solide fat content) : Le taux de solide SFD a été évalué selon la méthode de ISO (1995) ; chaque échantillon a été fondu dans un four à  $100^\circ\text{C}$  et après la filtration, le filtrat obtenu a été divisé en trois tubes (2 cm dans chaque tube). Les tubes ont été incubés pour 20 min dans différentes températures ( $20^\circ\text{C}$ ,  $30^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C}$ ).les résultats ont été lue à l'aide d'une appareil de résonance magnétique nucléaire et présenté en pourcentage.

#### **4.1.3. Évaluation de stabilité oxydative de margarine (test de Rancimat) :**

C'est un test accéléré plus utilisée dans l'évaluation de la stabilité ou résistance oxydative des huiles ou des graisses comestibles (Farhoosh, 2008).

3g de l'échantillon on été placée dans des conditions d'oxydation accéléré ( $120^\circ\text{C}$ , flux d'air 10l/h). En conséquence, les molécules volatiles ont été formées et retenus dans un tube contenant 60 ml de l'eau distillée, ce qui va augmenter leur conductivité. Les résultats ont été déterminés par le point d'inflexion de la courbe de conductivité (ISO, 2006).

## 4.2. Application des HE de *Citrus Limon* à la viande de bœuf hachée:

### 4.2.1. Préparation de la viande hachée fraîche incorporée avec de l'HE du *Citrus limon*:

La viande a été fournie par un fournisseur local, 1 heure après l'abattage ils ont arrivés au labo (préservé avec de la glace). Après le grincement de la viande ils ont traité avec de l'HE puis divisée en 5 portions (0.06% HE, 0.312%HE, 0.01% BHT, 0.01% BHT+0.312% HE) la 5ème portion est de contrôle, ils ont stockées dans des sacs en plastiques sous vide et préservé à 4°C pour 10 jours (Ben Hsouna et *al.*, 2017).

### 4.2.2. Analyses physico-chimiques:

**pH:** le pH a été déterminé selon la méthode de (Özyurt, 2011), pour les mélanges homogénéisés de l'eau distillée et la viande hachée par la proportion 1:10 w/v (poids /volume)

### 4.2.3. Évaluation de stabilité oxydative:

Selon le test TBARS (Test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique) (Eymard, 2005); dans un mélangeur de cuisine ils ont mélangé 2 g de l'échantillon avec 100µl de BHT et 1g/l de l'éthanol et 16 ml d'acide trichloroacétique, le mélange a été homogénéisé pendant 10 min et filtré. 2 ml de filtrat ont été ajoutés à 2 ml d'acide thiobarbiturique. Après le chauffage et le refroidissement des tubes fermés, ils ont mesurés leur absorbance contre le blanc. Les résultats ont été déterminés en MDA (malonaldehyde) a été déterminé selon l'équation suivante:

$$\text{mg MDA eq/kg} = (A \times \text{VTCA} \times 2 \times \text{MMDA} \times 10 - 2) / (1.56 \times m).$$

**A :** absorbance.

**VTCA :** volume de TCA.

**MDA :** coefficient d'extinction molaire.

## 4.3. Application des HE de *Citrus Limon* aux sardines salées:

### 4.3.1. Préparation des sardines salées et leur incorporation avec les HE:

Fraîches sardines ont été achetées d'un marché local et transportées au labo à 4-6°C. Puis ont été manuellement préparées (décapitation, abattage,..). Ces dernières ont été divisées en portions de 1.5 kg et ont été mises dans des bocaux de verre (volume 3L). Après, une quantité de 25 ml de microémulsion des HE de *Citrus limon* a été ajoutée (le contrôle a été préparé sans l'utilisation

des huiles essentielles). L'application de l'émulsion sur la surface des sardines à l'aide d'un pulvérisateur, et disposé "queue-tête" en couches et espacées entre elles avec du sel. Après ils ont les gardés sous pression (2kg pendant 1 mois, puis 1 kg jusqu'à la fin de maturation à 20°C pendant 150 jours) (Alfonzo et *al.*, 2016).

#### **4.3.2. Analyses sensorielles:**

Les paramètres liés à la texture (compacité, juteux et gommeux), à l'odeur et saveurs (goût de jambon, rance et putride) ont été évaluées sur une échelle de qualité sur 10 points [de 0, 00 (absence du descripteur) à 10, 00 (extrêmement intense)]. De plus, les effets d'origine sensorielle d'ajout des huiles essentielles aux poissons ont été évalués par un test d'acceptation (Alfonzo et *al.*, 2016).

#### **4.3.3. Détermination de taux d'Histamine:**

L'histamine est l'agent causal de l'empoisonnement aux scombroides, un danger chimique d'origine alimentaire (Lee, 2015). Les échantillons de sardines ont été analysés pour la détermination de leur teneur en histamine avant et après les salée et marinée, par extraction acide et dérivatisation. (Alfonzo et *al.*, 2016)

#### **4.3.4. Analyses microbiologiques:**

25 g d'un échantillon de sardine a été diluée (1:10w/v) dans une solution de ringer et bien homogénéisé (4 min) dans un stomacher. (M. Aponte, 2010) Le temps d'incubation et la température, et le milieu de culture pour chaque un des microorganismes ont été bien identifiée pour l'obtention des résultats (Aharon et Vanderberg, 1999).

### **4.4. Application des HE de citrus limon au concentre de tomate :**

#### **4.4.1. Application d'HE sur le concentré de tomate:**

Les huiles essentielles ont été ajoutées à des petits flacons en verre stériles, qui contiennent du concentré de tomate. Les doses des huiles essentielles ont été effectuées selon les résultats de la CMI. Les flacons ont été maintenus à 4°C à l'abri de la lumière (Himed et *al.*, 2020).

#### **4.4.2. Analyse microbiologiques:**

Ils ont appliquées une observation visuelle pour la detection des changements de couleur et presence des moisures, qui se fait chaque trois jour pendant une période d'un mois (Himed et *al.*, 2020).

# **Chapitre 3**

## **Résultats et Discussion**

## **1. Le rendement et l'apparence externe et caractéristique des HE**

### **1.1. Le rendement :**

Le rendement d'extrait de variétés *Lisbon* par pression à froid a été 0.81% (Himed et *al.*, 2016), pour l'extrait des fleurs végétal obtenu par l'hydrodistillation il est de 3%(Ben Hsouna et *al.*, 2017). Concernant le rendement des huiles essentielles extraites par pression à froid, il est de 1,24% (Himed et Merniz, 2018).

Par comparaison à d'autres travaux, les rendements d'extraction par hydrodistillation des huiles essentielles obtenus par Blanco Tirado et *al.* (1995) et Hellal (2011) sont de 0,19%, 0,70% respectivement. Le rendement d'extraction par pression à froid, selon (Himed et Barkat, 2014), est de l'ordre de 1, 02 %. Cette différence pourrait s'expliquer par l'effet de la période de récolte et les conditions environnementales (le climat, la zone géographique et le degré de fraîcheur), selon la variété des mêmes fruits et aussi le mode d'extraction peut influencer sur le rendement, les résultats d'hydrodistillation sont plus importants que celui obtenu par pression à froid. (Bourgou et *al.*, 2012).

### **1.2. Apparence externe**

L'HE obtenue à partir des fleurs fraîches ou bien le zeste de *Citrus limon* avait une odeur de citron, aspect huileux mais la couleur se diffère, selon la méthode d'extraction on a: l'huile extraite par hydrodistillation à une couleur jaune, jaune claire, l'huile extraite par pression à froid à une couleur jaune verdâtre.

### **1.3. Composition**

Les Tableaux 05 et 06 regroupent la composition chimique (des monoterpènes, les monoterpènes oxygénés) de la majorité des huiles essentielles de citron extraite. Les extraits végétaux récupérés par les deux modes d'extraction ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). Dix composants différents ont été identifiés dans les extraits étudiés qui sont :  $\alpha$ -Terpinène,  $\alpha$ -Pinène,  $\beta$ -Pinene, Myrcene, Limonene, Linalool,  $\alpha$ -Terpineol, Geranial,  $\alpha$ -Citral et Acetate.

L'analyse chimique de l'HE de citron a identifié comme principaux composés le Limonène, le  $\beta$ -Pinène et le  $\alpha$ -Terpinène avec des pourcentages de 66.75%, 13.92% et 3.10 %, respectivement, suivis d'autres composés à faible concentration :  $\alpha$ -Pinène (2.15%), Géraniol (2,76 %), Myrcène (1.41%), Linalool (1,50 %),  $\alpha$ -Citral (1,27 %) (Himed et *al.*, 2016).

**Tableau 05:** Composition chimique (les monoterpènes) des huiles essentielles du citron extraites analysées par GC/MS

Composant \ Source	$\alpha$ -Terpinène	$\alpha$ -Pinène	$\beta$ -Pinene	Myrcene	Limonene
(Himed et al., 2016)	3.10%	2.15%	13.92%	1.41%	66.75%
(Alfonzo et al., 2016)	3.78%	1.53%	12.74%	1.13%	59.48%
(Ben Hsouna et al., 2017)	7.30%	0.46%	25.44%	0.36%	39.74%
(Himed et al., 2020)	3.01%	10.33%	1.53%	1.03%	64.17%

NM: non mentionnée.

**Tableau 06:** Composition chimique (les monoterpènes oxygénés) des huiles essentielles du citron extraites analysées par GC/MS

Composant \ Source	Linalool	$\alpha$ -Terpineol	Geranial	$\alpha$ -Citral	Acetate
(Himed et al., 2016)	0.25%	0.36%	2.76%	1.27%	NM
(Alfonzo et al., 2016)	0.36%	2.01%	0.27%	1.98%	NM
(Ben Hsouna et al., 2017)	2.16%	7.30%	0.43%	NM	3.01%
(Himed et al., 2020)	0.41%	0.28%	0.34%	3.88%	NM

NM: non mentionnée.

Ces résultats sont en accord avec ceux des études de (Bourgou et al., 2012) et (G.Arcoleo, 2009), qui ont trouvés que le pourcentage des autres composés est très proche de ceux de cette recherche spécialement pour le limonène, ce dernier était le composé prédominant avec un pourcentage variant de 72,41% à 94,77% et 67.29% respectivement dans l'extrait de citron.

Il y a d'autres facteurs notamment le choix de la période de récolte, le climat, la zone géographique, la partie de la plante utilisée, la maturité du fruit, le degré de fraîcheur, la période de séchage. Ce sont des facteurs entre autres qui peuvent avoir un impact direct sur les rendements et les caractérisations des huiles essentielles.

## 2. L'activité biologique

### 2.1. Activité antioxydante

Le Tableau 07 regroupe les résultats du pouvoir antioxydant des échantillons, qui a été évalué par les tests suivants : test de blanchissement du  $\beta$ -carotène et le test DPPH.

**Tableau 07:** Les résultats d'activité antioxydante des huiles essentielles.

Partie utilisé	Méthode d'extraction	Resultats test blanchissement du $\beta$ -carotène		Resultats test DPPH		Références
		CE50 D'HE	CE50 Standard	CE50 D'HE	CE50 Standart	
Zeste	Pression à froid.	NM	NM	0.00012±0.00049mg/ml	Tocoblend : 0.000837 ± 0.000143 mg/ml.	Himed et <i>al.</i> , 2016
Zeste	Distillation à la vapeur	0.040 mg/ml	NM Vitamine C	0.015 mg/ml	NM	Ben Hsouna et <i>al.</i> , 2017

**CE50** : concentration efficace médiane.

**NM** : non mentionné.

#### 2.1.1. Test de piégeage de radical DPPH

Dans la présente étude, la capacité antioxydante de l'HE a été évaluée en utilisant la méthode de piégeage des radicaux DPPH en comparant avec l'activité de Tocoblend, aussi avec la vitamine C.

- L'activité de piégeage des radicaux de l'extrait végétal et de Tocoblend témoins positifs augmentait avec l'augmentation de la concentration ( $P < 0,05$ ). La présente étude a démontré que l'HE présentait une forte activité de piégeage des radicaux par rapport à Tocoblend standard (Ben Hsouna et *al.*, 2017).

- L'activité antiradicalaire des huiles extraites par pression à froid des variétés *Euréka* et *Lisbon* est plus importante que celle des huiles essentielles extraites par hydrodistillation des mêmes variétés.

Les résultats obtenus ont montrés que l'HE de citron possède un pouvoir de piégeage du radical DPPH plus important par rapport à la Tocoblend et l'acide ascorbique. Ces résultats nous permettent de déduire que les échantillons d'huiles essentielles testés ont la capacité de neutraliser les radicaux libres en leur donnant un atome d'hydrogène. Selon Leong et Shui (2002), tout composé ayant la capacité de neutraliser les radicaux libres DPPH, est considéré comme étant un excellent antioxydant (Ben Hsouna et *al.*, 2017).

### **2.1.2. Test de Blanchissement de $\beta$ - carotène :**

Les résultats de l'activité antioxydante obtenus par le test du blanchissement du  $\beta$ -carotène sont présentés dans le Tableau 6. Ce test utilisé a été évalué par une comparaison au contrôle négatif (éthanol), la vitamine E et aussi avec la Butylated hydroxytoluene (BHT).

Selon Ben Hsouna et *al.* (2017) le blanchissement au  $\beta$ -carotène après addition de l'HE et du BHT a servi de contrôle positif à différentes concentrations. Cette activité antioxydante de la HE a augmenté avec l'augmentation de la concentration. Une forte inhibition remarquable du blanchissement au  $\beta$ -carotène après 120 min d'incubation avec une CE50 de 40,147 mg/ml.

Les résultats obtenus (tableau 07) ont montrés que l'HE de citron possède un pouvoir de piégeage du radical DPPH plus important par rapport au standards. Ces résultats montrent que l'HE du citron semble être le meilleur inhibiteur de l'oxydation de l'acide linoléique (cette oxydation génère des radicaux peroxydes qui vont par la suite oxyder le  $\beta$ -carotène hautement insaturé, entraînant ainsi la disparition de sa couleur orange) par rapport à la vitamine E. Le  $\beta$ -carotène présente une activité antioxydante par comparaison au contrôle négatif (éthanol). Le changement des valeurs de l'absorbance du  $\beta$ - carotène, à différents intervalles de temps. L'activité antioxydante potentielle de l'HE dû à la présence de composés phénoliques et de limonène dans l'huile car leur fonction antioxydante (via le don d'électrons et d'atomes d'hydrogène) a été rapportée dans la littérature (Ben Hsouna et *al.*, 2017).

## **2.2. Pouvoir antimicrobien des HE**

La concentration minimale inhibitrice CMI a été déterminée pour connaître la concentration minimale d'huile essentielle pour inhiber la croissance des microorganismes par l'huile essentielle de *Citrus limon*.

Les tableaux 8 et 9 représentent les résultats de pouvoir antibactérien et antifongique respectivement. Cette étude a montré que l'HE du citron possède une activité antimicrobienne

plus ou moins importante, sur la croissance de souches testées (bactéries), pour l'inhibition de leur croissance, Les résultats montrent que toutes ces souches ont révélés une sensibilité vis-à-vis d'extrait végétal. Les bactéries de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*, ont les moins sensibles avec une concentration de 0.008 mg/ml et 0.004mg/ml, et la bactérie la plus sensible pour l'extrait d'HE de *Citrus limon* était *Staphylococcus aureus* selon Ben Hsouna et al. (2017).

Par comparaison à d'autres travaux, ces résultats pourraient être dus à la composition de la membrane des bactéries Gram négatif (Nikaido, 2003). En effet, ces dernières possèdent une membrane qui présente une perméabilité sélective; la surface des lipopolysacharides contient des charges négatives, qui empêchent la diffusion des molécules hydrophobes, et des porines qui bloquent le passage des molécules à haut poids moléculaire. A titre d'exemple, *Pseudomonas aeruginosa* contient dans sa membrane des porines de faibles perméabilités. Contrairement aux Gram négatif, les bactéries à Gram positif se sont montrées plus sensibles.

La sensibilité des souches bactériennes est plus importante pour les bactéries Gram positif que pour les bactéries Gram négatif.

**Tableau 08:** Les résultats de La sensibilité des souches bactériennes contre HE de Citrus limon.

Souches bactériennes testées	Concentrations inhibitrices	Referances
<i>Bacillus cereus</i> (G-)	1.25 ± 0.6 mg/ml	Ben Hsouna et al. (2017)
<i>Staphylococcus aureus</i> (G+)	[0.078] mg/ml	Ben Hsouna et al. (2017)
<i>Escherichia coli</i> (G-)	[0.004] mg/ml	Ben Hsouna et al. (2017)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (G-)	> 0.008 mg/ml	Ben Hsouna et al. (2017)
<i>Salmonella enterica</i> (G-)	[0.625 ± 0.4] mg/ml	Ben Hsouna et al. (2017)
<i>Bacillus subtilis</i> (G+)	[0.625 ± 0.4] mg/ml	Ben Hsouna et al. (2017)
<i>Staphylococcus epidermis</i> (G+)	[1.25 ± 0.6] mg/ml	Ben Hsouna et al. (2017)

G+ : gram positif ,

G- : gram négatif

**Tableau 09:** Les résultats de La sensibilité des souches fongiques contre HE de Citrus limon.

Souches testés	Concentrations inhibitrices	Referances
<i>Aspergillus terreus</i>	<7 mg/ml	Himed et al. (2016)
<i>Aspergillus niger</i>	0.625 ± 0.4 mg/ml	Ben Hsouna et al. (2017)
	<0.006 mg/ml	Himed et al. (2016)
<i>Aspergillus flavus</i>	0.312 ± 0.6mg/ml	Ben Hsouna et al. (2017)
	≥0.006 mg/ml	Himed et al. (2016)
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	<0.007 mg/ml	Himed et al. (2016)
<i>Fusarium oxysporum</i>	0.625 ± 0.5 mg/ml	Ben Hsouna et al. (2017)
	<0.004 mg/ml	Himed et al. (2016)
<i>Fusarium culmorum</i>	0.312 ± 0.8 mg/ml	Ben Hsouna et al. (2017)
	<0.004 mg/ml	Himed et al. (2016)

Cette étude a montré que l'HE du citron possède une activité antimicrobienne plus importante, sur la croissance de souches fongiques testées, pour l'inhibition de leur croissance, Les résultats montrent que toutes ces souches ont révélé une sensibilité vis-à-vis l'extrait végétal.

En ce qui concerne les résultats d'aromatogramme ou les diamètres d'inhibition sont représenté dans le tableau 10, d'après ces diamètres, toutes les souches fongiques testées sont sensibles vis-à-vis les huiles essentielles extraites par hydrodistillation (HEH) et par pression à froid(HEP), mais on note que les diamètres d'inhibition dans le cas de l'utilisation des HEP sont plus importants en comparaison avec celles de HEH. Cela signifie une activité antifongique des huiles HEP plus intéressante que celle des huiles HEH. L'activité de ces huiles essentielles est liée sans doute à l'ensemble de leurs constituants. (Deans et Dorman, 2000).

**Tableau 10:** Les résultats de diamètres des zones d'inhibitions (mm) des huiles essentielles de *Citrus limon* vis-à-vis les souches testées (Himed et al., 2020)

Souches testés	Diamètres d'inhibition (mm)	
	Huile extrait par hydrodistillation (HEH)	Huile extrait par pression à froid (HEP)
<i>Aspergillus terreus</i>	11 ± 0,09	12,8 ± 0,03
<i>Aspergillus niger</i>	12,4± 0,43	14,2 ± 1,41
<i>Aspergillus flavus</i>	12,1± 0,02	13,4 ± 1,12
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	11,9 ±0,09	13,6 ± 0,21
<i>Fusarium oxysporum</i>	13,8± 0,06	17,8 ±0,03
<i>Fusarium culmorum</i>	13,6 ±0,32	16,7 ± 0,03

### 3. Incorporation des huiles essentielles dans les produits alimentaires

#### 3.1. Margarine incorporée :

Le but de cette étude est l'obtention d'une margarine bio-conservée et l'effet des HEs de *Citrus limon* sur sa conservation.

##### 3.1.1. Caractéristiques physico-chimiques des margarines

**Tableau 11:** Caractéristiques physico-chimiques des margarines incorporées à l'HE.

Paramètres	Margarine au Tocoblend*	Margarine à l'HE 1**
Teneur en eau et en matières volatiles	15.76±0.003 (%)	15.50±0.090 (%)
pH	4.0 ± 0.162	4.03 ± 0.132
Indice de peroxyde (meq/kg)	1.97 ± 0.019	1.89 ± 1.123
Point de fusion (°C)	36 ± 0.011	35.43 ±0.078
Références	(Himed et al., 2016)	(Himed et al., 2016)

**Margarine au Tocoblend\*** : margarine incorporée avec le conservateur le plus utilisé dans l'industrie de margarine. (margarine témoin)

**Margarine à l'HE 1\*\*** : margarine incorporée avec de l'huile essentielle de *Citrus limon* de pression à froide.

Les résultats de la caractérisation physico-chimique des margarines élaborées (margarine avec le Tocoblend et margarines à HE1) sont représentés dans le tableau 11. On a noté que les deux pourcentages de la composition en eau et matière volatile des deux margarines élaborées ont des valeurs plus proches, c'est à dire que l'addition des HEs n'a pas affecté ce pourcentage significativement, cela est probablement parce que ce pourcentage est déterminée par la procédure de fabrication des margarines à tartinées, car si on compare ces résultats avec les résultats obtenus par Himed et Barkat (2014) qui ont appliquées les HEs de *Citrus limon* extraite par deux méthodes : pression à froid et hydrodistillation, respectivement codées HE2 et HE3, qui ont des pourcentages de HE2 : 15,98%, HE3 : 16,02% , et aussi en comparaison avec le travail de Merniz et Himed (2018), qui ont appliquées les huiles essentielles de *Citrus limon* (libre et encapsulée) extrait par hydrodistillation sur la margarine allégée (codée margarines à HE4, et à HE5) qui ont obtenu de résultats comme suit margarine à HE4: 39,63% et à HE5 : 39,59%, on constate que le type et les constituants de la margarine ont un effet sur ce pourcentage , car la margarine allégée est une margarine à faible teneur en matière grasse c'est pour ça elle a un taux élevé de matière volatile en comparaison avec celle de margarine normale, mais en tous cas, leurs teneurs en eau correspondent aux teneurs fixées dans la formulation de la margarine allégée (Vierling, 2003).

Les mesures des valeurs de pH ont été effectuées sur la phase aqueuse de la margarine. C'est un paramètre très important à connaître ; car il permet de prévenir le risque de contamination microbienne. On favorise une valeur basse de ce dernier pour freiner la croissance de la majorité des microorganismes. Le pH des margarines analysées varie entre 4 et 4,03. Ces résultats correspondent aux normes fixées généralement entre 4 et 5,5 (Karleskind, 1992)

L'indice de peroxyde rend compte de l'altération des corps gras par oxydation, inconvénient majeur touchant essentiellement les acides gras insaturés, leur valeur selon les normes doit être inférieure à 5 méq/kg (Karleskind, 1992). L'indice de peroxyde calculé dans les 2 margarines a été entre 1,87 et 1,97 méq/kg. Mais, en comparaison aux résultats obtenus par Himed et Merniz (2018), HE4 : 0,99 méq/kg et HE5 : 0,98 méq/kg. on note que les margarines allégées ont des valeurs notamment inférieures à celles des margarines élaborées, ces valeurs s'expliquent par le fait que l'auto-oxydation dépend loin des conditions de conservation et la durée, mais de la qualité initiale des huiles utilisées et la teneur et leur composition en acides gras insaturés, les huiles les plus insaturées sont les moins stables à l'oxydation (Cuvelier et Maillard, 2012).

Deux des indicateurs des propriétés organoleptiques ont été évaluée ; la valeur de point de fusion et le SFC (solid fat content). Les valeurs du point de fusion des margarines élaborées ont été de 35°C à 36 °C, ces points de fusion obtenus sont liés à la composition en acides gras des margarines, c'est à dire selon les produits utilisée (les huiles et graisses);si ils ont des acides gras saturés à longues chaînes ont des points de fusion plus élevés (Ghotra et *al.*, 2002). Le point de fusion doit être fixé de manière à ce que la margarine soit fondante dans la bouche mais aussi plastique à température ambiante pour supporter le travail mécanique lors de la tartinabilité (Karabulut et *al.*, 2004).

Concernant l'indice de solide (SFC), il se rapporte théoriquement au pourcentage de matières grasses qui sont solides à des températures différentes. Il est responsable de plusieurs caractéristiques du produit, y compris son aspect général et ses propriétés organoleptiques (Lida Noor et *al.*, 2002). Le taux du solide des margarines allégées tartinables ne doit pas dépasser 40% à 5°C et pas plus de 6% à 37°C (Kok et *al.*, 1999). Les valeurs obtenus ont été de 4.3% jusqu'à 4.4% à 35°C, c'est-à-dire ces margarines fondre facilement dans la bouche.

D'après les résultats précédents on peut dire que la méthode d'extraction, l'encapsulation, et la nature de la margarine (allégée), n'ont pas un effet éminent sur la qualité physico-chimique de margarine.

### 3.1.2. Stabilité oxydative de la margarine

**Tableau 12:** Les résultats de test Rancimat.

Paramètres	Margarine au Tocoblend	Margarine à l'HE 1
PI (h)	5.34±0.028	9.02 ± 0.014
Références	(Himed et <i>al.</i> , 2016)	(Himed et <i>al.</i> , 2016)

**PI\***: L'indice de peroxyde.

**Margarine au Tocoblend\*\*** : margarine incorporée avec le conservateur le plus utilisé dans l'industrie de margarine. (Margarine témoin).

**Margarine à l'HE 1\*\* \***: margarine incorporée avec de l'huile essentielle de *Citrus limon* de pression a froide.

L'oxydation lipidique des aliments est un problème qui se pose de plus en plus en agroalimentaire. Elle tend notamment à diminuer la durée de conservation du produit, leur goût, et sa qualité nutritionnelle (Choe et Min, 2007). Les résultats de la stabilité à l'oxydation

mentionné dans le tableau 12 des margarines au Tocoblend, et aux huiles essentielles de *Citrus limon* par le test de Rancimat, ces résultats montrent qu'il y a un effet en cas d'addition des HEs sur la durée d'induction. Les résultats de la margarine incorporée avec les HE obtenus par pression à froid ont la meilleure résistance à l'oxydation forcée par rapport aux résultats de Himed et Barkat (2014) et de Himed et Merniz (2018). Les résultats obtenus par Himed et Barkat (2014) qui ont appliqués les HEs de *Citrus limon* extraite par deux méthodes : pression à froid et hydrodistillation, respectivement codées HE2 et HE3, le travail de Merniz et Himed (2018), qui ont appliqués les huiles essentielles de *Citrus limon* (libre et encapsulée) extrait par hydrodistillation sur la margarine allégée (codée margarines à HE4, et à HE5). Ceci pourrait être dû à la nature de l'huile utilisée dans la préparation des margarines, qui sont riches en acides gras saturés qui favorisent les phénomènes d'oxydation, compte à l'utilisation de puissants antioxydants (les différentes huiles essentielles extraites). Les margarines à l'huile essentielle ont mieux résisté à la peroxydation que celle au Tocoblend. La margarine à l'HE1 est mieux protégée contre l'oxydation puis celle à l'HE5 : 7,01h (huiles essentielles encapsulées), et après les restes qui ont presque les mêmes résistances (HE2 : 6,42, HE3 : 6,31, HE4 : 6,32). On note que la margarine à l'HE2 (huiles extraites par pression à froid aussi comme l'HE1), mais leur résistance n'était pas élevée comme celle de HE1. Cette contradiction est due à la variance des variétés de citron ou la saison de récolte (Hussain et al., 2010). Les margarines au HE3, HE4 ont été incorporées avec des huiles essentielles extraites par hydrodistillation, leurs valeurs ont été presque les mêmes.

### 3.2. Viandes incorporées:

Dans cette étude un type de viandes rouges (viande de bœuf hachée), celle-ci a été incorporée avec les HEs extraites des fleurs de *Citrus limon*, enrobée avec et sans de BHT (dehydroxytoluènebutylé).

#### 3.2.1. Caractéristiques physico-chimiques des produits alimentaires :

**Tableau 13:** Changement de pH des viandes pendant 10 jours de conservation réfrigérée.

Paramètres	Contrôle	Viande à HE1		
		T1	T2	T3
pH 0	5.66	5.59	5.57	5.57

pH 10	7.0	6.24	6.19	6.10
Références	(Ben Hsouna et <i>al.</i> , 2017)	Ben Hsouna et <i>al.</i> , 2017)	(Ben Hsouna et <i>al.</i> , 2017)	Ben Hsouna et <i>al.</i> , 2017)

**pH0** : valeur initiale.

**T2** : viande hachée avec HE à 0.312%.

**pH10** : la valeur finale après 10jours.

**T3** : viande hachée avec HE à 0.312% et 0.01% BHT (dehydroxytoluène butylé).

**T1** : viande hachée avec HE à 0.06%.

La valeur de pH de viande peut être différente après l'abattage et influencé par divers facteurs, notamment l'âge, sexe, nutrition et conditions d'abattage. Pendant le stockage, le pH est affecté par la variation des composés azotés et l'activité des bactéries. La dissociation des composés azotés (protéines) entraîne une augmentation de pH pendant le stockage. Les bactéries protéolytiques jouent cependant un rôle important, les bactéries consomment en premier lieu des glucides, qui sont suivis par les acides aminés. L'ammoniac est produit en raison de la consommation des acides aminés par les bactéries, entraînant une augmentation du pH (Behbahani et Fooladi, 2018).

D'après le tableau 13 on note qu'il y a une augmentation progressive du pH pendant le stockage, il n'y avait pas de différences significatives entre les 3 échantillons initiales, après les 10 jours on note une augmentation légère dans les pH de chaque échantillon. La valeur initiale du pH de l'échantillon témoin (viande non traité) a été 5.66 et après la durée de conservation leur pH a augmenté jusqu'à 7. Nous constatons aussi que le pH de la viande traitée avec l'huile essentielle varie entre 5,57 et 6,24 pendant la période de conservation. Pour les échantillons de viande hachée traités avec l'huile essentielle à des concentrations de 0.06% et 0.312% des HEs sans le BHT ont presque les mêmes valeurs de pH, mais après l'addition de BHT, la valeur de pH finale a légèrement diminué à 6.1. Dans l'autre côté, en comparaison avec les résultats de Noshard *et al.* (2021) ; la viande de buffle enrobée avec le PMSM (*Plantago major* mucilage de graines) et 2% d'HEs extrait de zeste de citron, a montré un changement léger dans la valeur de pH, c'est-à-dire elle a été la plus efficace dans le maintien d'un pH presque constant, la viande enrobée avec de PMSM seulement a aussi une valeur de pH moindre que celle de la viande hachée traitée avec l'HE 0.312% +BHT. Enfin on peut dire que l'addition des HE avec PMSM ou BHT a un effet, mais selon le pourcentage d'HE.

### 3.2.2.Évaluation de stabilité oxydative TBARS :

**Tableau 14:** Less valeurs de TBARS de la viande hachée pendant les 10 jours de conservation.

Paramètres	Contrôle	Viande à HE1		
		T1	T2	T3
TBRAS0	0.2 ± 0.14	0.2 ± 0.08	0.18 ± 0.2	0.19 ± 0.19
TBRAS 10	3.96 ± 0.15	1.8 ± 0.15	1.7 ± 0.13	0.55 ± 0.12
Références	(Ben Hsouna et <i>al.</i> , 2017)			

**TBRAS 0** : valeur initiale.

**T2** : viande hachée avec HE à 0.312%.

**TBRAS 10** : la valeur finale après 10jours.

**T3** : viande hachée avec HE à 0.312% + 0.01% BHT (dehydroxytoluènebutylé).

**T1** : viande hachée avec HE à 0.06%.

Les valeurs TBARS représentent les contenus secondaires produits d'oxydation des lipides, principalement des aldéhydes et carbonyles d'hydrocarbures, qui provoquent l'apparition des arômes indésirables dans les Viandes (Safa et G, 2016).

Les résultats du degré de peroxydation des lipides de la viande révèlent que le taux d'oxydation des échantillons non traités avec l'huile essentielle ont augmenté avec une façon brusque avec le temps jusqu'à où elle atteint 3.96 mg de malonaldehyde/kg, Le témoin atteint des valeurs au dessus de la limite fixée par la norme et qui est égale à 2mg de MDA/kg (Campo et *al.*, 2006).

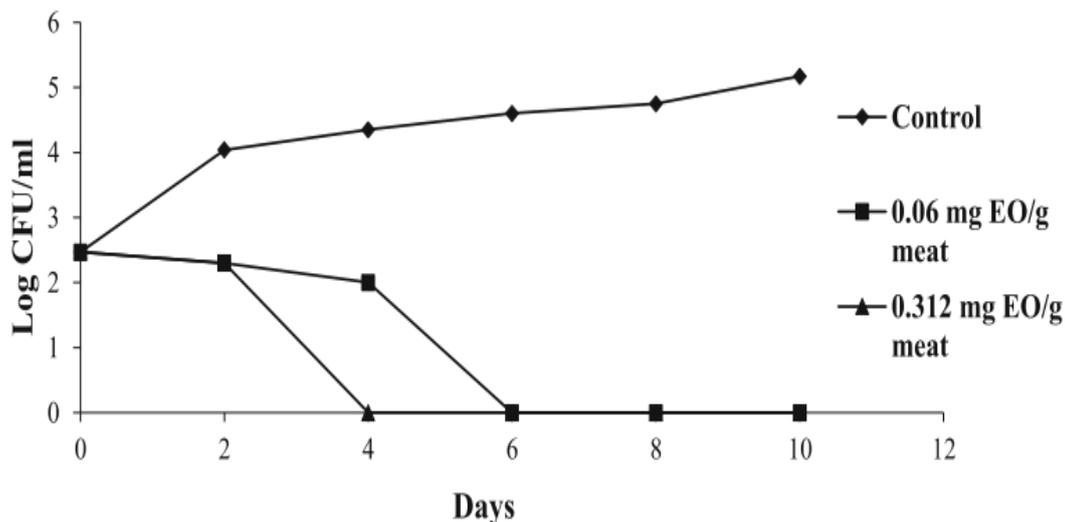
Pour les échantillons traité avec l'HE (0.06% et 0.312%) nous constatons que leur taux d'oxydation augmente un peu jusqu'à où il atteint 1.8 mg de MDA/kg comme une valeur maximale.

Les échantillons traités avec l'HE (0.312%) +BHT leurs valeurs d'oxydation sont légèrement augmenté dans les jours finals de stockage avec une valeur de 0.55 mg de MDA/kg. Cela pourrait s'expliquer en grande partie par l'intervention des molécules responsables de la stabilité oxydative tels que les polyphénols et les flavonoïdes contenus dans les HEs de *Citrus limon* (Eymard et Genot, 2003).

Nous concluons que l'huile essentielle de *Citrus limon* à un effet antioxydant, en particulier à une concentration de 0.312 + BHT son effet antioxydant est très remarquable. Ces résultats ont été confirmés selon Djenane et L (2011), Les HEs possèdent des propriétés antioxydantes et antiradicalaires qui améliorent la durée de vie des aliments. Ainsi

l'incorporation des HES directement dans les aliments, sous forme de vapeurs ou dans un emballage actif contribuent à préserver l'aliment des phénomènes d'oxydation.

### 3.2.3. Analyses microbiologiques:



**Figure 6:** Survie en fonction du temps de *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 à 4 °C après un traitement avec des concentrations croissantes de HES (Ben Hsouna et al, 2017)

Selon les résultats de (Ben Hsouna et *al.*, 2017), ils ont concentrée sur l'efficacité antimicrobienne des HES contre le développement de *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 dans la viande hachée stockée à 4°C. Pour cela et pour testé le mécanisme d'action de ces bactéries, ils ont préparée deux échantillons avec des huiles essentielles (0.06%,0.312%), les résultats sont bien illustrés dans la figure 06. Au jour n° 0, ils ont les mêmes taux de *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 dans toutes les échantillons de viandes hachées. après 6 à 4 jours de stokage on note que le nombre de *L. monocytogenes* était réduit de 2,5 cycles Log.

Depuis ces résultats on peut constatée que le temps de Storage a un effet significatif sur la croissance de *L. monocytogenes*.

Le nombre de *L. monocytogenes* reste inférieur à une valeur significative ( $p < 0,05$ ) jusqu'à la fin de l'expérience (10 jours). En effet, l'ajout des HES à 0.06% et 0.312% pourrait retarder considérablement *Listeria monocytogenes* pendant la période de stockage de la viande. Ces résultats peuvent s'expliqués par: L'activité antibactérienne des terpènes bien connue. Ils traversent la paroi cellulaire et perméabilisent la membrane cytoplasmique, en détruisant la structure multicouche des polysaccharides, des acides gras et des phospholipides.

Chez les bactéries, ces événements sont associés à une perte d'ions et à une réduction du potentiel membranaire, ce qui conduit à l'effondrement de la pompe à protons et à la lyse (Marotta S. M, 2016). Comme il n'y avait souvent aucune corrélation entre l'activité anti-*Listeria* et les principaux composants chimiques, il est possible qu'il y ait une relation plus complexe avec la composition chimique (qui inclut les composants mineurs) (Lis-Balchin et Deans, 1997).

### 3.3 Sardines incorporées:

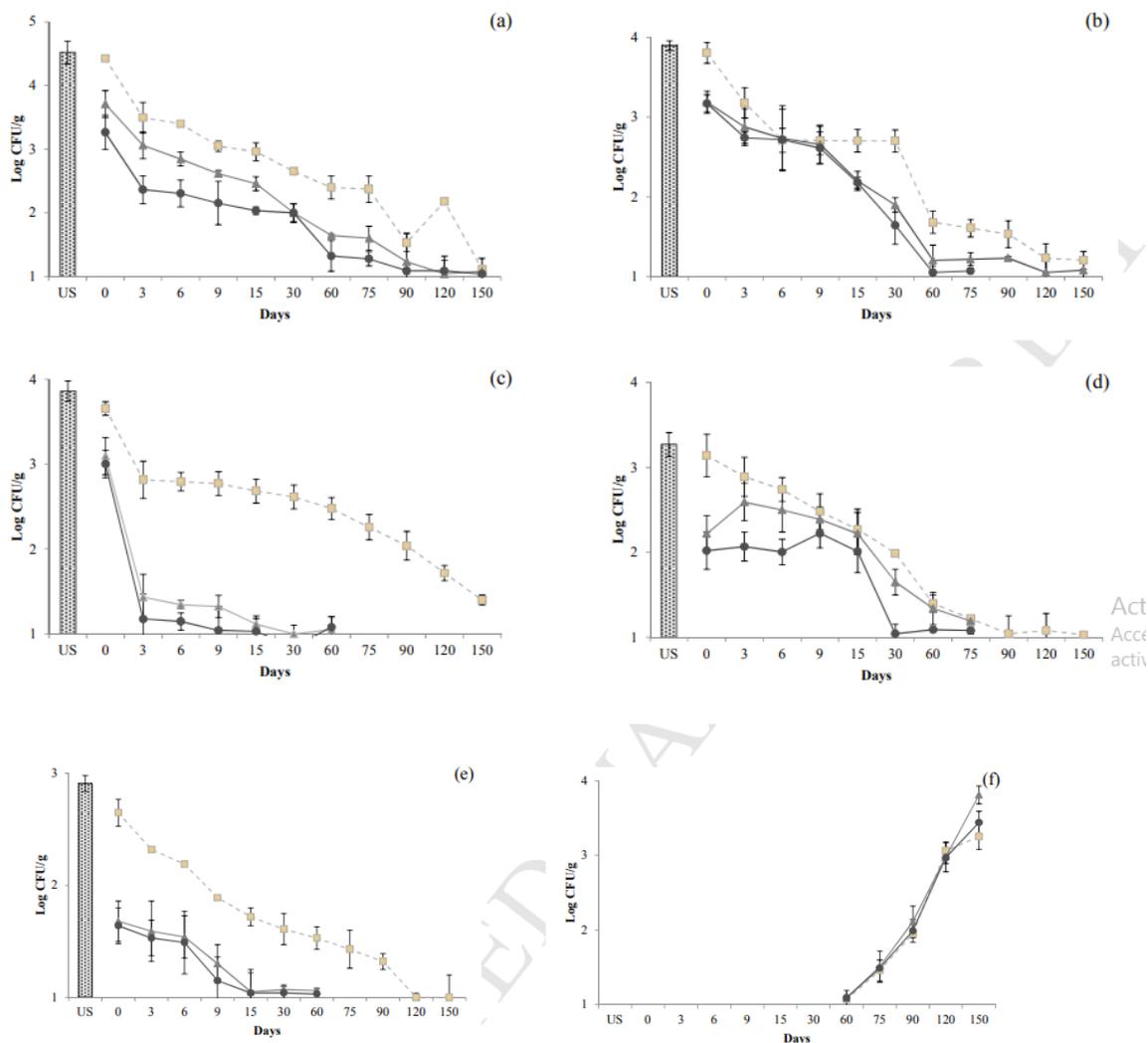
Les produits salés ont été préparés dès les années anciennes, alors leur innovation et amélioration est le but de cette étude, Par leur incorporation avec les HEs de *Citrus limon*.

#### 3.3.1. Analyses microbiologiques :

L'activité antimicrobienne des HE dans les aliments est importante pour inhiber la prolifération ainsi que pour réduire les populations de bactéries pathogènes ou d'altérations. Dans cette étude, les sardines salées ou filet ont été incorporé avec l'HEs de *Citrus limon*, les résultats de leurs activités antimicrobiennes sont présentés dans la figure 07.

Le dénombrement total des bactéries viables a diminué immédiatement après l'addition des HEs et de sel, parce que les agents pathogènes microbiens associés aux aliments proviennent principalement des matières premières et/ou de la contamination croisée lors de processus de traitement des aliments (Seymour et Appleton, 2001). On note que le taux de TMC (total microbial counts) , *Entérobactéries* et *staphylocoques* atteignant les niveaux de 3,40, 2,15 et 1,65 log UFC/g, respectivement, alors que les échantillons témoins (non traité) ont eu une grande augmentation de concentration de TMC, *coques* et *bâtonnets* bactéries lactiques, *Enterobacteriaceae* et *Staphylocoques* de 4,20, 4,33, 3,90, 3,10 et 2,24 log UFC/g, respectivement ; aucune bactérie halophile n'a été détectée.

Les *entérobactéries* comprennent plusieurs espèces et souches reconnues comme pathogènes opportunistes pour l'homme, le risque associé à la contamination par les entérobactéries devrait être réduit lors de la fabrication des aliments.



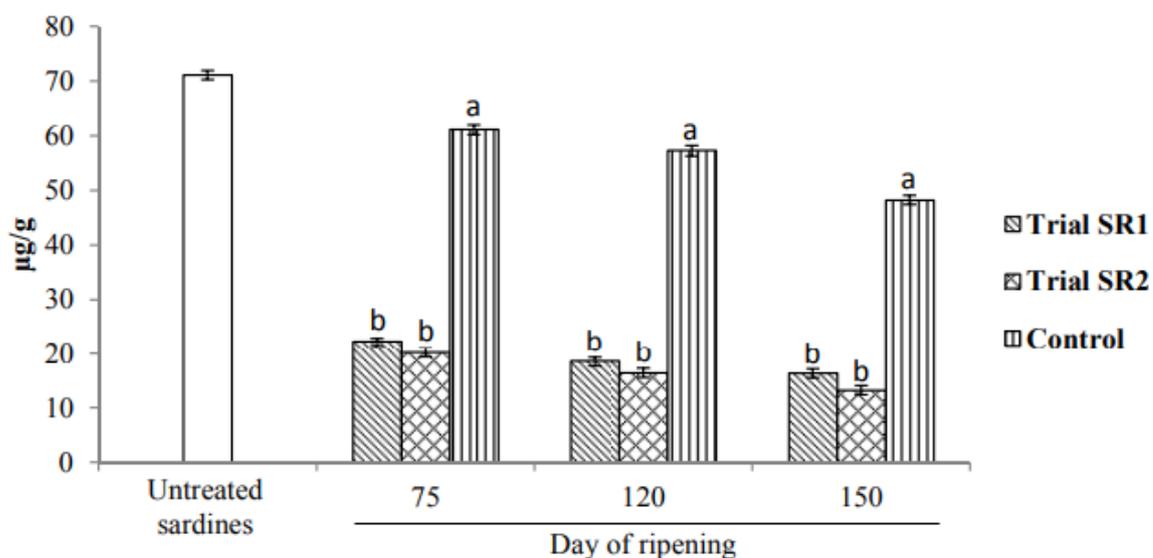
Results indicate mean values  $\pm$  standard deviation of three measurements.  
 Letters between brackets per each graphs indicate: (a), PCA, total aerobic mesophilic microorganisms; (b), M17, coccus lactic acid bacteria; (c), MRS, rod lactic acid bacteria; (d), VRBGA, *Enterobacteriaceae*; (e), BP, *Staphylococcaceae*; (f), HMAM, extremely halophilic archaea bacteria.  
 Abbreviation: US, untreated sardines (before the addition of EOs and salt).  
 Symbols: ■, control; ▲, SR1; ●, SR2.

**Figure 7:** Les concentrations microbiologiques (log CFU/g) pendant la durée de maturation (150j) des sardines salées (Alfonzo et al., 2016)

Dans les aliments à base de viande et de poisson, l'activité de décarbonylation des souches d'*entérobactéries* pourrait entraîner à la production des amines biogènes telles que la putrescine, la cadavérine et l'histamine (van Schaik, 2016). Pendant la durée de maturation (150j) les valeurs d'*Enterobacteriaceae*, *staphylococci* et les bactéries lactiques ont enregistré des valeurs significativement moindre que celles de témoin. Les deux échantillons SR1 (échantillon 1) et SR2 (échantillon 2) incorporés avec les HEs et le sel ont des résultats un peut différentes, par exemple les valeurs de populations de Famille des *entérobactéries* et *staphylocoques* entre 15 et 90 j ; celles-ci deux populations étaient moins concentrées dans

l'essai SR2 ( $< 1,5 \log \text{ UFC/g}$ ). À la fin de maturation c'est à dire après 150 jours, les *entérobactéries* et les *staphylocoques* ont disparu des deux essais expérimentaux et ils n'étaient détectables que dans les sardines de témoin à  $1,2 \log \text{ UFC/g}$ . Les bactéries halophiles ont apparu à partir du jour 30 ( $1,0 \log \text{ UFC/g}$ ) jusqu'à la fin de la maturation ( $3,5 \log \text{ UFC/g}$ ) à la fois dans les essais expérimentaux et témoins. Bien que la diminution des concentrations microbiennes est couramment rapportée pendant la période de maturation des poissons salés (Aponte et B, 2010), ainsi que pour la majorité des aliments salés (Francesca et B, 2016), la présence de nombreuses populations microbiennes pendant la maturation des poissons salés a été clairement associée à une augmentation de la teneur en histamine dans les produits finaux (FDA, 1998).

Les limites d'histamine pour les produits de la pêche et/ou salés ont été établies à 400 et 500 ppm en Europe et aux États-Unis respectivement, d'après les résultats obtenus de taux d'histamine (Alfonzo et al., 2016) les deux essais traités avec de l'HE de citron ont montré



**Figure 8:** Le taux d'histamine dans les différents échantillons de sardine salée (Alfonzo et al., 2016)

Une diminution plus rapide dans la concentration d'histamine à partir des 75 jours. Bien que l'essai SR2 ait montré les valeurs les plus faibles d'histamine ( $12 \mu\text{g/g}$ ) pendant les échantillons de contrôles ont  $48,23 \mu\text{g/g}$ .

### 3.3.2. Analyses sensorielles:

Les effets d'origine sensorielle de l'ajout d'HE de citron aux poissons salés ont été positivement enregistrés par les panélistes, aucune odeur indésirable n'a été détectée dans les sardines salées expérimentales après 75, 120 et 150 jours de maturation. Le processus de

salage et l'addition des HEs conduit à l'obtention d'un produit tendre avec un arôme et un goût spécifiques et agréables (Aponte et *al.*, 2010).

### **3.4. Concentré de tomate incorporée :**

L'objectif ici est de valoriser les huiles essentielles de *Citrus limon*, d'évaluer leur activité antifongique, et les appliquer sur le concentré de tomate.

#### **3.4.1. Analyses microbiologiques:**

Les HEs dans cette étude (Himed et *al.*, 2020) ont été extraits par deux méthodes; pression à froide et hydrodistillation, le rendement de chaque méthode d'extraction se diffère, et les constituants se diffèrent aussi. Alors, leur activité antifongique va être différente car l'activité de ces huiles essentielles est liée sans doute à l'ensemble de leurs constituants. Selon Deans et Dorman (2000) ; l'activité antimicrobienne d'une huile essentielle est reliée essentiellement à ses composés majoritaires, mais sans négliger l'effet synergique des constituants mineurs. Les résultats obtenus dans cette étude aussi ont prouvé ce qui a été mentionnée précédemment; selon l'observation visuelle des échantillons, pendant un mois de conservation, on constate que le témoin (sans HEs) a subi des changements de couleur et une altération par les moisissures, pendant les échantillons traités avec les HE sont luttés contre toutes proliférations fongiques, on note aussi que l'activité antifongique des HEs extraites par pression à froid sont plus intéressantes que celle des huiles extraites par hydrodistillation (Himed et *al.*, 2020), celle-ci est confirmée par les résultats de l'aromatogramme précédemment présenté.

# **Conclusion**

## Conclusion

À cause de la pandémie mondiale due au virus *Corona (Covid 19)*, nous n'étions pas en mesure de fournir notre propre étude. Nous avons donc compilé et comparé des articles sur l'application de l'huile essentielle de *Citrus limon* pour la conservation de certains produits alimentaires.

Les principaux résultats obtenus montrent que l'hydrodistillation est le procédé ayant donné un meilleur rendement en HE à partir du zeste et fleurs de *Citrus limon*. Un effet marquant de la variété (*Euréka* a le rendement le plus élevé) en ce qui concerne la composition chimique des huiles essentielles extraites, avec une dominance du limonène suivi de l' $\alpha$ -pinène et le  $\gamma$ -terpinène comme des principaux composants.

L'activité antioxydante déterminée par : le test de DPPH et le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène, a montré l'efficacité des HE de citron en tant qu'agent antioxydant. Tout composé ayant la capacité de neutraliser les radicaux libres DPPH, est considéré comme étant un excellent antioxydant. L'HE semble être le meilleur inhibiteur de l'oxydation de l'acide linoléique selon le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène.

Le test antimicrobien a révélé que toutes les souches microbiennes ont montré une sensibilité aux huiles essentielles testées. Les paramètres microbiologiques étudiés montrent que l'activité antibactérienne était plus intéressante pour les bactéries Gram positif que pour les bactéries Gram négatif les bactéries de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* étaient les moins sensibles.

D'autre part l'addition des huiles essentielles aux aliments n'a pas un effet éminent sur leurs qualités physico-chimiques.

En ce qui concerne l'activité antioxydant. Le citron a un effet antioxydant très remarquable, spécialement quand il a été incorporé avec un stabilisant comme le BHT. L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Citrus limon* incorporée aux aliments a montré la présence d'une activité antibactérienne et antifongique très importante pendant la période de conservation, ce traitement a révélé aussi une efficacité remarquable en réduisant le taux d'histamine (déchet bactérienne dans les viandes). Les résultats montrent aussi que les huiles essentielles utilisées ont agi sur la durée de conservation des aliments efficacement comparativement aux conservateurs synthétiques (Tocobland).

Les analyses sensorielles en général ont été dans le coté positif, en ajoutant une fraîcheur au gout.

A l'issu de ces résultats, il serait intéressant de mener une étude plus approfondie sur les extraits de *Citrus limon* et leur application dans différents aliments, donc il est souhaitable :

D'identifier les compositions chimiques de l'huile essentielle de *Citrus limon* et l'extrait aqueux de *Citrus limon* et la comparaison entre les deux.

D'étudier l'activité antioxydante et antifongique des huiles essentielles et des extraits aqueux dans quelques aliments.

D'isoler les composants actifs des huiles essentielles et d'extraits aqueux et leurs applications sur quelques aliments (fruits et légumes).

# **Références Bibliographique**

- Adel F. Ahmed, F. A. (2019). Antioxidant activity and total phenolic content of essential oils and extracts of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) plants. *Food Science and Human Wellness*.
- AFNOR. (1982). *Recueil de normes françaises des produits dérivés des fruits et légumes jus de fruits*. Paris: AFNOR.
- Alfonzo, A., Martorana, A., Guarrasi, V., & Barbera, M. (2016). Effect of the lemon essential oils on the safety and sensory quality of salted sardines (*Sardina pilchardus* Walbaum 1792).
- Ahron, R., & Vanderberg, J. P. (1999). Plasmodium berghei: Induction of aminopeptidase in malaria-resistant strain of *Anopheles gambiae*. *Experimental Parasitology*93, 101-104.
- Aponte M., B. G. (2010). Could halophilic archaea improve the traditional salted anchovies (*Engraulis encrasicolus* L.) safety and quality? *Letters in Applied Microbiology*, 697-703.
- Behbahani, A., & Fooladi, I. (2018). Development of a novel edible coating made by Balangu seed mucilage and Feverfew essential oil and investigation of its effect on the shelf life of beef slices during refrigerated storage through intelligent modeling. *Journal of Food Safety*.
- Ben Hsoun, A., Ben Halima, N., Smaoui, S., & Hamdi, N. (2017). Citrus lemon essential oil: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. *Lipids in Health and Disease*.
- Billerbeck, V.-G. (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, 249-253.
- BlancoTirado, C., Stashenko, E. E., & Combariza, M. Y. (1995). Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. 501-513.
- Bourgou, S., Rahali, F., Ourghemmi, I., & Saidani Tounsi, M. (2012). Modifications de la composition en huile essentielle de zeste de quatre agrumes tunisiens au cours de la maturation des fruits. *Scientific World Journal*.
- Campo M. M., N. G. (2006). Flavour perception of oxidation in beef. *Meat Science*, 303–311.
- Chen, C. L. (1992). Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GS-MS). Dans D. C. Lin S.Y., *Methods in Lignin Chemistry* (pp. 527-548).
- Chanthaphon, S., S. C. (2008). Original Article Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical Citrus spp. against food-related microorganisms. *Songklanakarin J. Sci.*, 125-131.
- Choe, E., & Min, D. (2007). Chemistry of Deep-Fat Frying Oils. *Journal of Food Science*, 72(5), R77–R86., 77-86.

- Cuvelier, M., & Maillard, M. N. (2012). Stabilité des huiles alimentaires au cours de leur stockage. *OCL Oilseeds and fats crops and lipids*, 125-132.
- Deans, S., & Dorman, H. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, 308-316.
- Djenane D., L. K. (2011). Composition chimique et activité anti-Salmonella enteritidis CECT 4300 des huiles essentielles d'Eucalyptus globulus, de Lavandula angustifolia et de Satureja hortensis. Tests in vitro et efficacité sur les œufs entiers liquides conservés à  $7 \pm 1$  °C. *Phytothérapie*, 343-353.
- Eristanna, P., Vito, A. L., & Maria, A. G. (2013). Current and Potential Use of Citrus Essential Oils. *Current Organic Chemistry*, 3042-3049.
- Eymard, S., Carcouet, E., Rochet, M., & Dumay, J. (2005). Development of lipid oxidation during manufacturing of horse mackerel surimi. *J Sci Food Agric.*
- Eymard, S., & Genot, C. (2003). A modified xylenol orange method to evaluate formation of lipid hydroperoxides during storage and processing of small pelagic fish. *A modified xylenol orange method to evaluate formation of lipid hydroperoxides during storage and processing of small pelagic fish. European Journal of Lipid and Science technology*, 497-.
- Farhoosh, R. N. (2008). Kinetic parameter determination of vegetable oil oxidation under Rancimat test conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 581-592.
- FDA. (1998). FDA and EPA guidance levels. *In Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guide, (2nd Eds.)*, 245–248. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Center for: Washington, DC: Office of Seafood.
- Francesca N., B. M. (2016). Optimised method for the analysis of phenolic compounds from caper (Capparis spinosa L.) berries and monitoring of their changes during fermentation. *Food Chemistry*, 1172–1179.
- G. Arcoleo, M. I. (2009). Improving olive oil shelf life with lemon essential oil.
- Ghotra B.S., D. S. (2002). Lipid shortenings: a review. *Food Res. Int.*, 1015-1048.
- Hammer, K. A. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 985–990.
- Hellal, Z. (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (Sardina pilchardus). Tizi-ouzou: Université Mouloud Mammeri.

- Himed , L., Merniz, S., & Barkat, M. (2016). Evaluation of the chemical composition and antioxidant activity of Citrus limon essential oil and its application in margarine preservation. *Algerian Journal of Natural Products*, 316-322.
- Himed, L., Merniz, S., Benbraham, M., Boudjouada, E., & Barkat, M. (2020). PRESERVATION DU CONCENTRE DE TOMATE PAR UN AGENT ANTIFONGIQUE (HUILE ESSENTIELLE DU CITRON). *African Journal of Food Agric. Nutrition Developement*, 15608-15618.
- Himed, L., & Barkat, M. (2014). Élaboration d'une nouvelle margarine additionnée des huiles essentielles de Citrus limon. *EDP sciences*.
- Himed & Merniz, «Évaluation des activités biologiques des huiles essentielles du citron (Citrus limon): encapsulation et application comme agent conservateur à la margarine allégée», Thèse de doctorat en Sciences, Constantine, Université Freres Mentouri, (2018, 06 25), 111p.
- Hussain, A., Nigam, P., Ashraf, M., & Gilani, A. (2010). Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four Mentha species. *Science of Food and Agriculture*, 1827-1836.
- ISO. (1995). Animal and vegetable fats and oils. *Method 8292 (F),determination of the solids fat by the method of pulsed nuclear magnetic resonance (2nd ed.)*. ISO international standard.
- ISO. (1998). Animal and vegetable fats and oils. *Method 3960,Determination of peroxide index*. ISO international standard.
- ISO. (2002). Animal and vegetable fats and oils. *Method 6321, Determination of melting point*. ISO international standard.
- ISO. (2006). Animal and vegetable fats and oils. *Method 6886, Determination of the oxidation stability (accelerated oxidation test) (2nd ed.) pp. 1–14*. ISO international standard.
- Juntachote, T., Berghofer, E., Siebenhandel, S., & Bauer, F. (2005). The antioxidative properties of Holy basil and Galangal in cooked ground pork. *ELSEVIER*, 446-456.
- Kamiri, M. (2011, Février 22). Biologie de la reproduction des hybrides somatiques tétraploïdes d'agrumes ; implication sur la structure génétique des populations d'hybrides générées dans les croisements diploïdes x tétraploïdes. UNIVERSITE DE CORSE-PASCAL PAOLI.
- Karabulut, I., Turan, S., & Ergin, G. (2004). Effects of chemical interesterification on solid fat content and slip melting point of fat/oil blends. *European Food Research and Technology*, 224-229.
- Karleskind, A. (1992). *Manuel des corps gras* (Vol. 1500). (T. e. Lavoisier, Éd.) Paris ; Londres ; New York.

- Kehal, F, «Utilisation de l'huile essentielle de Citrus limon comme agent conservateur et aromatique dans la crème fraîche». Thèse de magister en sciences alimentaires, Constantine, UNIVERSITE CONSTANTINE 1, Algerie, 2013, 124p
- Kok, L. L., Fehr, W. R., Hammond, E. G., & White, P. J. (1999). Trans-Free Margarine from Highly Saturated Soybean Oil. *JAOCS*, 1175-1181.
- Lee, Y.-C., Lin, C.-S., Liu, F.-L., Huang, T.-C., & Tsai, Y.-H. (2015). Degradation of histamine by *Bacillus polymyxa* isolated from salted fish products. *Journal of Food and Drug Analysis*, 836-844.
- Leong, L.P., and Shui, G. (2002) An Investigation of Antioxidant Capacity of Fruits in Singapore Markets. *Food Chemistry*, 69-75.
- Lida Noor, H. M. (2002). TAG composition and solid fat content of palm oil, sunflower oil, and palm kernel olein belends before and after chemical interesterification. *TAG composition and solid fat content of palm oil, sunflower oil, and palm kernel olein belends before and after chemical interesterification*, 1137-1144.
- Lis-Balchin M., e. D. (1997). Bioactivity of selected plant essential oils against listeria monocytogenes. *Journal of Applied Microbiology*, 759–762.
- Mahato, N., Sharma, K., Sinha, M., Baral, E., & Hwan Cho, M. (2017, Novembre 09). Citrus essential oils: Extraction, authentication and application in food preservation.
- Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., & Kefalas, P. (2005). Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry*, 411-420.
- Marotta S. M., G. F. (2016). Evaluation of the antibacterial activity of bergamot essential oils on different *Listeria monocytogenes* strains. *Italian Journal of Food Safety*.
- Mayachiew, P., & Devahastin, S. (2008). Antimicrobial and Antioxidant Activities of Indian Gooseberry and Galangal Extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 1153-1159.
- Meziane, M. (2013). Assainissement et Régénération des Plantes d'Agrumes par l'Embryogenèse Somatique à partir de la culture de Stigmate et Style. Ecole Nationale Supérieur d'Agronomie, El-Harrach, Alger.
- Nikaido, H. (2003). Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 593–656.
- Noshard, M., Behbahani, B., & Jooyandeh, H. (2021). Utilization of *Plantago major* seed mucilage containing Citrus limon essential oil as an edible coating to improve shelf-life of buffalo meat under refrigeration conditions. *Food Science & Nutrition*, 1625-1638.

- Özyurt, G., Kuley, E., Özkütük, S., & Özogul, F. (2008). Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness. *Food Chemistry*, 505-510.
- Reynal, B., & Multon, J.-L. (2009). *Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires*. Paris: TEC et DOC.
- Safa H., G. P. (2016). Physicochemical, Biochemical and Instrumental Attributes and Consumer Acceptability of Dry-Fermented Sausages Elaborated with Combined Partial Substitutions of Sodium Chloride and Pork Backfat. *Food and Nutrition Sciences*, 1297-1314.
- Seymour, I., & Appleton, H. (2001). *Foodborne viruses and fresh produce*. *Journal of Applied Microbiology*.
- van Schaik, W. (2016). The human gut resistome. *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences*.
- Vierling, E. (2003). *Biosciences et techniques: Filières et produits Broché* (Vol. 270).
- Wolff, J. (1968). *Manuel d'analyse des corps gras*. Paris, Azoulay, France.

# **Les articles analysés**

## Matériel et Méthodes

- AFNOR. (1982). *Recueil de normes françaises des produits dérivés des fruits et légumes jus de fruits*. Paris: AFNOR.
- Ahron, R., & Vanderberg, J. P. (1999). Plasmodium berghei: Induction of aminopeptidase in malaria-resistant strain of Anopheles gambiae. *Experimental Parasitology* 93, 101-104.
- Alfonzo, A., Martorana, A., Guarrasi, V., & Barbera, M. (2016). Effect of the lemon essential oils on the safety and sensory quality of salted sardines (*Sardina pilchardus* Walbaum 1792).
- Aponte M., B. G. (2010). Could halophilic archaea improve the traditional salted anchovies (*Engraulis encrasicolus* L.) safety and quality? *Letters in Applied Microbiology*, 697-703.
- Ben Hsoun, A., Ben Halima, N., Smaoui, S., & Hamdi, N. (2017). Citrus lemon essential oil: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. *Lipids in Health and Disease*.
- Billerbeck, V.-G. (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, 249-253.
- Bourgou, S., Rahali, F., Ourghemmi, I., & Saidani Tounsi, M. (2012). Modifications de la composition en huile essentielle de zeste de quatre agrumes tunisiens au cours de la maturation des fruits. *Scientific World Journal*.
- Chen, C. L. (1992). Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GS-MS). Dans D. C. Lin S.Y., *Methods in Lignin Chemistry* (pp. 527-548).
- Chanthaphon, S., S. C. (2008). Original Article Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical Citrus spp. against food-related microorganisms. *Songklanakarin J. Sci.*, 125-131.
- Eymard, S., Carcouet, E., Rochet, M., & Dumay, J. (2005). Development of lipid oxidation during manufacturing of horse mackerel surimi. *J Sci Food Agric*.
- Farhoosh, R. N. (2008). Kinetic parameter determination of vegetable oil oxidation under Rancimat test conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 581-592.
- Hammer, K. A. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 985-990.
- Himed, L., Merniz, S., & Barkat, M. (2016). Evaluation of the chemical composition and antioxidant activity of Citrus limon essential oil and its application in margarine preservation. *Algerian Journal of Natural Products*, 316-322.

- Himed & Merniz, «Évaluation des activités biologiques des huiles essentielles du citron (Citrus limon): encapsulation et application comme agent conservateur à la margarine allégée», Thèse de doctorat en Sciences, Constantine, Université Frères Mentouri, (2018, 06 25), 111p.
- Himed, L., Merniz, S., Benbraham, M., Boudjouada, E., & Barkat, M. (2020). PRESERVATION DU CONCENTRE DE TOMATE PAR UN AGENT ANTIFONGIQUE (HUILE ESSENTIELLE DU CITRON). *African Journal of Food Agric. Nutrition Developement*, 15608-15618.
- ISO. (1995). Animal and vegetable fats and oils. *Method 8292 (F),determination of the solids fat by the method of pulsed nuclear magnetic resonance (2nd ed.)*. ISO international standard.
- ISO. (1998). Animal and vegetable fats and oils. *Method 3960,Determination of peroxide index*. ISO international standard.
- ISO. (2002). Animal and vegetable fats and oils. *Method 6321, Determination of melting point*. ISO international standard.
- ISO. (2006). Animal and vegetable fats and oils. *Method 6886, Determination of the oxidation stability (accelerated oxidation test) (2nd ed.) pp. 1–14*. ISO international standard.
- Juntachote, T., Berghofer, E., Siebenhandel, S., & Bauer, F. (2005). The antioxidative properties of Holy basil and Galangal in cooked ground pork. *ELSEVIER*, 446-456.
- Kehal, Farida. (2013, 06 27). Utilisation de l'huile essentielle de Citrus limon comme agent conservateur et aromatique dans la crème fraîche. Constantine, UNIVERSITE CONSTANTINE 1, Algerie.
- Lee, Y.-C., Lin, C.-S., Liu, F.-L., Huang, T.-C., & Tsai, Y.-H. (2015). Degradation of histamine by *Bacillus polymyxa* isolated from salted fish products. *Journal of Food and Drug Analysis*, 836-844.
- Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., & Kefalas, P. (2005). Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry*, 411-420.
- Mayachiew, P., & Devahastin, S. (2008). Antimicrobial and Antioxidant Activities of Indian Gooseberry and Galangal Extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 1153-1159.
- Özyurt, G., Kuley, E., Özkütük, S., & Özogul, F. (2008). Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness. *Food Chemistry*, 505-510.
- Wolff, J. (1968). *Manuel d'analyse des corps gras*. Paris, Azoulay, France.

## Résultats et Discussion

- Alfonzo, A., Martorana, A., Guarrasi, V., & Barbera, M. (2016). Effect of the lemon essential oils on the safety and sensory quality of salted sardines (*Sardina pilchardus* Walbaum 1792).
- Aponte M., B. G. (2010). Could halophilic archaea improve the traditional salted anchovies (*Engraulis encrasicolus* L.) safety and quality. *Letters in Applied Microbiology*, 697-703.
- Behbahani, A., & Fooladi, I. (2018). Development of a novel edible coating made by Balangu seed mucilage and Feverfew essential oil and investigation of its effect on the shelf life of beef slices during refrigerated storage through intelligent modeling. *Journal of Food Safety*.
- Ben Hsoun, A., Ben Halima, N., Smaoui, S., & Hamdi, N. (2017). Citrus lemon essential oil: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities with its preservative effect against *Listeria monocytogenes* inoculated in minced beef meat. *Lipids in Health and Disease*.
- BlancoTirado, C., Stashenko, E. E., & Combariza, M. Y. (1995). Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. 501-513.
- Bourgou, S., Rahali, F., Ourghemmi, I., & Saidani Tounsi, M. (2012). Modifications de la composition en huile essentielle de zeste de quatre agrumes tunisiens au cours de la maturation des fruits. *Scientific World Journal*.
- Campo M. M., N. G. (2006). Flavour perception of oxidation in beef. *Meat Science*, 303–311.
- Choe, E., & Min, D. (2007). Chemistry of Deep-Fat Frying Oils. *Journal of Food Science*, 72(5), R77–R86., 77-86.
- Cuvelier, M., & Maillard, M. N. (2012). Stabilité des huiles alimentaires au cours de leur stockage. *OCL Oilseeds and fats crops and lipids*, 125-132.
- Deans, S., & Dorman, H. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, 308-316.
- Eymard, S., & Genot, C. (2003). A modified xylenol orange method to evaluate formation of lipid hydroperoxides during storage and processing of small pelagic fish. . *A modified xylenol orange method to evaluate formation of lEuropean Journal of Lipid and Science technology* , 497-.
- FDA. (1998). FDA and EPA guidance levels. *In Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guide, (2nd Eds.)*, 245–248. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Center for: Washington, DC: Office of Seafood.

- Francesca N., B. M. (2016). Optimised method for the analysis of phenolic compounds from caper (*Capparis spinosa* L.) berries and monitoring of their changes during fermentation. *Food Chemistry*, 1172–1179.
- G. Arcoleo, M. I. (2009). Improving olive oil shelf life with lemon essential oil .
- Ghotra B.S., D. S. (2002). Lipid shortenings: a review. *Food Res. Int.*, 1015-1048.
- Hellal, z. (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Tizi-ouzou: Université Mouloud Mammeri.
- Himed , L., Merniz, S., & Barkat, M. (2016). Evaluation of the chemical composition and antioxidant activity of Citrus limon essential oil and its application in margarine preservation. *Algerian Journal of Natural Products*, 316-322.
- Himed, L., & Barkat, M. (2014). Élaboration d'une nouvelle margarine additionnée des huiles essentielles de Citrus limon. *EDP sciences*.
- Himed & Merniz, «Évaluation des activités biologiques des huiles essentielles du citron (*Citrus limon*): encapsulation et application comme agent conservateur à la margarine allégée», Thèse de doctorat en Sciences, Constantine, Université Freres Mentouri, (2018, 06 25), 111p.
- Himed, L., Merniz, S., Benbraham, M., Boudjouada, E., & Barkat, M. (2020). PRESERVATION DU CONCENTRE DE TOMATE PAR UN AGENT ANTIFONGIQUE (HUILE ESSENTIELLE DU CITRON). *African Journal of Food Agric. Nutrition Development*, 15608-15618.
- Hussain, A., Nigam, P., Ashraf, M., & Gilani, A. (2010). Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *Science of Food and Agriculture*, 1827-1836.
- Karabulut, I., Turan, S., & Ergin, G. (2004). Effects of chemical interesterification on solid fat content and slip melting point of fat/oil blends. *European Food Research and Technology*, 224-229.
- Karleskind, A. (1992). *Manuel des corps gras* (Vol. 1500). (T. e. Lavoisier, Éd.) Paris ; Londres ; New York.
- Kehal, F, «Utilisation de l'huile essentielle de Citrus limon comme agent conservateur et aromatique dans la crème fraîche». Thèse de magister en sciences alimentaires, Constantine, UNIVERSITE CONSTANTINE 1, Algerie, 2013, 124p
- Kok, L. L., Fehr, W. R., Hammond, E. G., & White, P. J. (1999). Trans-Free Margarine from Highly Saturated Soybean Oil. *JAACS*, 1175-1181.
- Leong , L. P., & Shui, G. (2002). An Investigation of Antioxidant Capacity of Fruits in Singapore Markets. *Food Chemistry*.

- Lida Noor, H. M. (2002). TAG composition and solid fat content of palm oil, sunflower oil, and palm kernel olein blends before and after chemical interesterification. *TAG composition and solid fat content of palm oil, sunflower oil, and palm kernel olein blends before and after chemical interesterification*, 1137-1144.
- Lis-Balchin, M., & Deans, S. (2003, October 30). Bioactivity of selected plant essential oils against *listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, 759–762.
- Marotta S. M., G. F. (2016). Evaluation of the antibacterial activity of bergamot essential oils on different *Listeria monocytogenes* strains. *Italian Journal of Food Safety*.
- Nikaido, H. (2003). Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 593–656.
- Noshard, M., Behbahani, B., & Jooyandeh, H. (2021). Utilization of *Plantago major* seed mucilage containing Citrus limon essential oil as an edible coating to improve shelf-life of buffalo meat under refrigeration conditions. *Food Science & Nutrition*, 1625-1638.
- Safa H., G. P. (2016). Physicochemical, Biochemical and Instrumental Attributes and Consumer Acceptability of Dry-Fermented Sausages Elaborated with Combined Partial Substitutions of Sodium Chloride and Pork Backfat. *Food and Nutrition Sciences*, 1297-1314.
- Seymour, I., & Appleton, H. (2001). *Foodborne viruses and fresh produce*. *Journal of Applied Microbiology*.
- van Schaik, W. (2016). The human gut resistome. *Philosophical Transactions of The Royal Society B Biological Sciences*.
- Vierling, E. (2003). *Biosciences et techniques: Filières et produits Broché* (Vol. 270).

# Résumé

## المخلص

الزيوت الأساسية تحتوي على جزيئات طبيعية تعتبر من مضادات الأكسدة ومضادات الميكروبات التي تعمل كمواد حافظة طبيعية للحفاظ على الطعام من التغيرات المختلفة. تهدف هذه الدراسة إلى بيان اثر الليمون الحامض على حفظ الأغذية ; من خلال استخلاص زيوت الأساسية وتقييم النشاط البيولوجي لهذه الزيوت المستخرجة بطريقتين: التقطير المائي والضغط على البارد ، وأخيراً تطبيقها على مركز الطماطم والسمن واللحوم و السردين. تمت دراسة النشاط المضاد للأكسدة للزيوت المستخلصة باختبارين DPPH و  $\beta$ -carotene ، بينما نشاط مضادات الميكروبات والفطريات تم تقييمها في المختبر على الزيوت الأساسية (بطريقة رسم الأروماتوغرافي والانتشار على أجار) وكذلك على الأطعمة المدمجة مع هذه الزيوت الأساسية، إلى جانب ذلك تم إجراء اختبارات تذوق على هذه الأطعمة المدمجة مع الزيوت أيضاً. أظهرت النتائج الرئيسية التي تم الحصول عليها أن التقطير المائي هو العملية التي أعطت مردوداً أفضل من الزيت العطري. أما فيما يتعلق بنتائج النشاط المضاد للأكسدة ، فقد سمح بتصنيف الزيوت الأساسية من الليمون الحامض المستخرج من بين مضادات الأكسدة الأكثر قوة ، ويظهر النشاط المضاد للميكروبات لهذه الزيوت نشاطاً مضاداً للبكتيريا مثيراً للاهتمام ونشاطاً مضاداً للفطريات معتبراً. أظهر تقييم النشاط البيولوجي للزيوت الأساسية المدمجة في الغذاء أن نشاطها المضاد للبكتيريا والفطريات مهم جداً خلال فترة التخزين ، وأظهر أيضاً أن الزيوت الأساسية المستخدمة لها تأثير على فترة صلاحية الطعام بشكل فعال مقارنة بالمواد الحافظة الصناعية. كانت التحليلات الحسية بشكل عام في الجانب الإيجابي ، مضيفة نضارة للطعم ، وفي نهاية هذه الدراسة ، يمكن اعتبار الزيت العطري للليمون الحامض مادة حافظة واعدة للغاية في صناعة الأغذية.

**لكلمات المفتاحية:** الزيت الاساسي ، الليمون الحامض، فترة الصلاحية ، النشاط البيولوجي ، الاغذية .

## Résumé

Les huiles essentielles ont des molécules naturelles considérées comme des antioxydants et antimicrobiens servent comme conservateurs naturels, pour préserver les aliments des différentes altérations. Cette étude a pour objectifs de valoriser l'effet des huiles essentielles (HEs) de *Citrus limon* sur la conservation des aliments ; par l'extraction et l'évaluation de l'activité biologique de ces huiles extraites par deux méthodes: hydrodistillation et pression à froid, et enfin les appliquer à la margarine, concentré de tomate, les viandes et les sardines. L'activité antioxydante des huiles extraites a été étudiée à l'aide des deux tests DPPH et  $\beta$ -carotène, tandis que l'activité antimicrobienne et antifongique ont été déterminés *in vitro* dans les huiles essentielles (Méthode d'aromatogramme et diffusion sur agar) et aussi sur les aliments incorporés avec ces huiles essentielles, à coté de ça des analyses sensorielles aussi ont été appliquées. Les principaux résultats obtenus montrent que l'hydrodistillation est le procédé ayant donné un meilleur rendement en huile essentielle. En ce qui concerne les résultats de l'activité antioxydante, ils ont permis de classer les huiles essentielles de *Citrus limon* extraits parmi les antioxydants puissants. L'activité antimicrobienne de ces huiles montre une activité antibactérienne plus intéressante pour les bactéries et une activité antifongique non négligeable. L'évaluation de l'activité biologique de l'huile essentielle incorporée aux aliments a montré que leur activité antibactérienne et antifongique est très importante pendant la période de conservation, et a montré aussi que les huiles essentielles utilisé ont agit sur la durée de conservation des aliments efficacement comparativement aux conservateurs synthétiques. Les analyses sensorielles en générale ont été dans le coté positive, en ajoutant une fraîcheur au gout. Au terme de cette étude, l'huile essentielle de *Citrus limon* pourrait être considérée comme un agent conservateur très prometteur pour l'industrie alimentaire.

**Les mots clés :** *Huiles essentielles, Citrus limon, conservation, activité biologique, les aliments.*

## Abstract

Essential oils have natural molecules considered to be antioxidants and antimicrobials serve as natural preservatives, to preserve food from various alterations. This study aims to evaluate the effect of essential oils (EOs) of *Citrus limon* on food preservation; by extracting and evaluating the biological activity of these oils extracted by two methods: hydrodistillation and cold pressing, and finally applying them on margarine, tomato concentrate, meats and sardines. The antioxidant activity of the extracted oils was studied by two tests DPPH and  $\beta$ -carotene, while the antimicrobial and antifungal activity were determined in vitro in essential oils (Method of aromatogram and dilution of agar) and also on the foods incorporated with these essential oils, besides that sensory analyzes were also applied on these incorporated foods. The main results obtained show that hydrodistillation is the process that gave the better yield of essential oil. Regarding the results of the antioxidant activity, they allowed us to classify the essential oils of *Citrus limon* extracted among the more powerful antioxidants. The antimicrobial activity of these oils shows an interesting antibacterial activity for bacteria and a significant antifungal activity. The evaluation of the biological activity of the essential oil incorporated in food has shown that their antibacterial and antifungal activity is very important during the storage period, and also showed that the essential oils used have an effective effect on the duration of food preserving compared to synthetic preservatives. Sensory analyzes in general were on the positive side, adding freshness to the taste. At the end of this study, the essential oil of *Citrus limon* could be considered as a very promising preservative for the food industry.

**The key words:** *Essential oil, Citrus limon, biological activity, conservation, food.*

## المخلص

الزيوت الأساسية تحتوي على جزيئات طبيعية تعتبر من مضادات الأكسدة ومضادات الميكروبات التي تعمل كمواد حافظة طبيعية للحفاظ على الطعام من التغيرات المختلفة. تهدف هذه الدراسة إلى بيان اثر الليمون الحامض على حفظ الأغذية ; من خلال استخلاص زيوتها الأساسية وتقييم النشاط البيولوجي لهذه الزيوت المستخرجة بطريقتين: التقطير المائي والضغط على البارد ، وأخيراً تطبيقها على مركز الطماطم والسمن واللحوم و السردين. تمت دراسة النشاط المضاد للأكسدة للزيوت المستخلصة باختبارين DPPH و  $\beta$ -carotene ، بينما نشاط مضادات الميكروبات والفطريات تم تقييمها في المختبر على الزيوت الأساسية (بطريقة رسم الأروماتوغرافي والانتشار على أجار) وكذلك على الأطعمة المدمجة مع هذه الزيوت الأساسية، إلى جانب ذلك تم إجراء اختبارات تذوق على هذه الأطعمة المدمجة مع الزيوت أيضاً. أظهرت النتائج الرئيسية التي تم الحصول عليها أن التقطير المائي هو العملية التي أعطت مردوداً أفضل من الزيت العطري. أما فيما يتعلق بنتائج النشاط المضاد للأكسدة ، فقد سمح بتصنيف الزيوت الأساسية من الليمون الحامض المستخرج من بين مضادات الأكسدة الأكثر قوة ، ويظهر النشاط المضاد للميكروبات لهذه الزيوت نشاطاً مضاداً للبكتيريا مثيراً للاهتمام ونشاطاً مضاداً للفطريات معتبراً. أظهر تقييم النشاط البيولوجي للزيوت الأساسية المدمجة في الغذاء أن نشاطها المضاد للبكتيريا والفطريات مهم جداً خلال فترة التخزين ، وأظهر أيضاً أن الزيوت الأساسية المستخدمة لها تأثير على فترة صلاحية الطعام بشكل فعال مقارنة بالمواد الحافظة الصناعية. كانت التحليلات الحسية بشكل عام في الجانب الإيجابي ، مضيقة نضارة للطعم ، وفي نهاية هذه الدراسة ، يمكن اعتبار الزيت العطري الليمون الحامض مادة حافظة واعدة للغاية في صناعة الأغذية.

**الكلمات المفتاحية:**الزيت الاساسي ، الليمون الحامض،فترة الصلاحية ، النشاط البيولوجي ،الأغذية.

## Résumé

Les huiles essentielles ont des molécules naturelles considérées comme des antioxydants et antimicrobiens servent comme conservateurs naturels, pour préserver les aliments des différentes altérations. Cette étude a pour objectifs de valoriser l'effet des huiles essentielles (HEs) de *Citrus limon* sur la conservation des aliments ; par l'extraction et l'évaluation de l'activité biologique de ces huiles extraites par deux méthodes: hydrodistillation et pression à froid, et enfin les appliquer à la margarine, concentré de tomate, les viandes et les sardines. L'activité antioxydante des huiles extraites a été étudiée à l'aide des deux tests DPPH et  $\beta$ -carotène, tandis que l'activité antimicrobienne et antifongique ont été déterminés *in vitro* dans les huiles essentielles (Méthode d'aromatogramme et diffusion sur agar) et aussi sur les aliments incorporés avec ces huiles essentielles, à coté de ça des analyses sensorielles aussi ont été appliquées. Les principaux résultats obtenus montrent que l'hydrodistillation est le procédé ayant donné un meilleur rendement en huile essentielle. En ce qui concerne les résultats de l'activité antioxydante, ils ont permis de classer les huiles essentielles de *Citrus limon* extraits parmi les antioxydants puissants. L'activité antimicrobienne de ces huiles montre une activité antibactérienne plus intéressante pour les bactéries et une activité antifongique non négligeable. L'évaluation de l'activité biologique de l'huile essentielle incorporée aux aliments a montré que leur activité antibactérienne et antifongique est très importante pendant la période de conservation, et a montré aussi que les huiles essentielles utilisés ont agi sur la durée de conservation des aliments efficacement comparativement aux conservateurs synthétiques. Les analyses sensorielles en générale ont été dans le coté positive, en ajoutant une fraîcheur au goût. Au terme de cette étude, l'huile essentielle de *Citrus limon* pourrait être considérée comme un agent conservateur très prometteur pour l'industrie alimentaire.

**Les mots clés :** Huiles essentielles, *Citrus limon*, conservation, activité biologique, les aliments.

## Abstract

Essential oils have natural molecules considered to be antioxidants and antimicrobials serve as natural preservatives, to preserve food from various alterations. This study aims to evaluate the effect of essential oils (EOs) of *Citrus limon* on food preservation; by extracting and evaluating the biological activity of these oils extracted by two methods: hydrodistillation and cold pressing, and finally applying them on margarine, tomato concentrate, meats and sardines. The antioxidant activity of the extracted oils was studied by two tests DPPH and  $\beta$ -carotene, while the antimicrobial and antifungal activity were determined *in vitro* in essential oils (Method of aromatogram and dilution of agar) and also on the foods incorporated with these essential oils, besides that sensory analyzes were also applied on these incorporated foods. The main results obtained show that hydrodistillation is the process that gave the better yield of essential oil. Regarding the results of the antioxidant activity, they allowed us to classify the essential oils of *Citrus limon* extracted among the more powerful antioxidants. The antimicrobial activity of these oils shows an interesting antibacterial activity for bacteria and a significant antifungal activity. The evaluation of the biological activity of the essential oil incorporated in food has shown that their antibacterial and antifungal activity is very important during the storage period, and also showed that the essential oils used have an effective effect on the duration of food preserving compared to synthetic preservatives. Sensory analyzes in general were on the positive side, adding freshness to the taste. At the end of this study, the essential oil of *Citrus limon* could be considered as a very promising preservative for the food industry.

**The key words:** Essential oil, *Citrus limon*, biological activity, conservation, food.