

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONMIQUE

Thèse

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTEUR EN
SCIENCES AGRONOMIQUES

Option : SIENCES ALIMANTAIRES.

Thème

Application de technique innovante de type micro-onde à
l'extraction des huiles essentielles des citrus d'Algérie.

Présenté par : M. ABOUDAOU MALEK

Jury:

Président	: Mme. Ferhat Z.	Professeur. (E.N.S.A.).
Directeur de thèse	: Mr. Ferhat M.A.	M.C.A. (E.N.S.).
Co directeur de thèse	: Mr. Hazzit M.	Professeur. (E.N.S.A.).
Examineurs	: Mr. Djenane D.	Professeur. (U.M.M.T.O).
	: Mr. Ouelhadj A.	M.C.A. (U.M.M.T.O).

Année universitaire 2016/2017

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

- À ma chère maman.*
- À ma femme et mes enfants.*
- À toute ma famille.*
- À tous mes amis.*
- À tous ceux qui me sont chers.*

MALEK

Remerciements

*Au terme de ce travail, il m'est agréable d'exprimer mes sincères remerciements à Mon directeur de thèse **Mr FERHAT mohamed amine**, maitre de confèrnee classe A à l'ENS kouba, pour la confiance qu'elle m'a toujours manifestée, l'aide, les orientations et les conseils judicieux prodigués tout le long de ce travail. Je lui souhaite toute la réussite le long de sa carrière.*

*Je tiens à exprimer mes sincères gratitudes à mon Co directeur de thèse **Mr HAZZIT mohamed** professeur à l'ENSA, pour m'avoir dirigé, conseillé, et encouragé ainsi pour sa bonne volonté, sa patience et ses précieux conseils qu'il m'a prodigués tout au long de ce travail.*

*Mes remerciements vont également à **Mme. FERHAT Z.**, professeur à l'ENSA, pour ses conseils précieux, son soutien et sa disponibilité, ainsi que de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury.*

*Je tiens aussi à dire grand merci à **Mr DJENANE djamel**, Professeur à UMMTO de tizi ousou, pour ses conseils précieux, son soutien et sa disponibilité, ainsi que de m'avoir fait l'honneur d'accepter de m'associer a sont equipe de travail à UMMTO de tizi ousou et d'avoir accepté d'examiner cette thèse et faire partie du jury*

*Je tiens aussi à remercier chaleureusement **Mr OUELHADJ akli**, Maitre de Conférence classe A à UMMTO de tizi ousou d'avoir accepté d'examiner cette thèse et faire partie du jury.*

Ma gratitude va à l'équipe de la station de l'ITAF – Boufarik, qui ont fourni tous les échantillons de Citrus dont j'avais besoin. Ma gratitude va aussi à l'équipe d'UMMTO de tizi ousou département de sciences bilogiques et agronomiques.

Mes remerciements vont aussi l'ensemble du personnel d'ENSA, Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-chimiques (CRAPC).

Je ne saurai jamais assez remercier toute ma famille, en particulier ma mère, ma femme, mes frères, mes belles soeurs et beaux frères, mon beau père, mes Oncles pour les sacrifices et l'amour qu'ils ont témoigné à mon égard.

Ma gratitude va également à tous mes amis(es) qui m'ont aidé par leur présence et leur amitié, particulièrement Aziz,Said , Nabil, rachda, Dyhia, kamal, Farid, lynda, Zohir, Nassim, Idir, Hakim, Karim.

Je remercie également, Docteur Moussa moukhtari du CRAPC, qu'il trouve ici mes vives remerciements et ma gratitude pour son aide si précise et pour son encouragement tout le long de mon parcours.

Je tiens aussi à remercier notre DG Mr issiakhem tahar, qu'il trouve ici mes vifs remerciements et ma gratitude pour son aide et pour son encouragement tout le long de mon parcours. Je tiens aussi à remercier Mr zitouni qui m'a tellement aidé et conseiller.

Merci à Mme Djenane Fatiha, Mohamed megdoud et Othmane akbi, amis et collègues de laboratoire de contrôle de qualité de la sarl iso 9 international, pour leur esprit de groupe qui m'a aidé à surmonter les moments difficiles.

Enfin, je tiens à exprimer mes sincères gratitude à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux constituants des essences et huiles essentielles de citrus.....	16
Tableau 2 : Les composants rencontrés dans l'essence d'orange douce (Di Giacomo, 1974)..	18
Tableau 3 : Recensement de quelques plantes soumises à une extraction par micro-ondes....	38
Tableau 4 : Composition moyenne de l'oeuf (par 100 g ; oeuf sans coquille), d'après Suveur, 1988; Gittins et Overfield, 1991 ; Blum et Suveur, 1996 ; Yamamoto et al.,1997 Cité par (Nys et Suveur, 2004)	57
Tableau 5 : composition moyenne de l'œuf (100g de produit frais) en vitamines et minéraux et couverture de besoin de l'homme adulte (Nys et Suveur, 2004).....	58
Tableau 6 : Bactéries et température de croissance (LEYRAL et VIERLING 1997).....	65
Tableau 7 : Exemples d'altérations des denrées par des bactéries psychrotrophes (Bornert, 2000).....	69
Tableau 8 : Conditions opératoires de l'ESSAM.....	74
Tableau 9 : Conditions opératoires de HD.	76
Tableau 10 : Conditions opératoires de l'expression à froid.....	77
Tableau 11 : Conditions opératoires des analyses en chromatographie en phase gazeuse.....	78
Tableau 12 : Conditions opératoires des analyses en CG/SM.....	79
Tableau 13 : Variables naturelles et codées, appliquées aux facteurs testés.....	91
Tableau 14 : Rendement en huile essentielle de L'orange la variété Valencia late selon 3 méthodes d'extraction.....	93
Tableau 15 : La composition chimique HE d'orange Valencia late (<i>Citrus sinensis</i> L.) obtenus par extraction ; ESSAM, HD et CP à partir des écorces.....	97
Tableau 16 : Propriétés physiques de l'huile essentielle d'Orange douce (Valencia late) extraite par HD et par ESSAM.....	102
Tableau 17 : Composés majoritaires dans les huiles essentielles de Valencia late.....	104
Tableau 18 : Caractéristiques des composés majoritaires de l'huile essentielle d'orange douce Valencia late extraite par ESSAM et HD.....	107
Tableau 19 : Expériences réalisées dans le plan expérimental et rendements obtenus....	111
Tableau 20 : Données obtenues à partir de l'analyse de la variance du modèle statistique..	112

Tableau 21 : Coefficients du modèle.....	115
Tableau 22 : Valeurs expérimentales et calculées du rendement en huile essentielle.....	116
Tableau 23 : Conditions optimales du rendement.....	117
Tableau 24 : Propriétés antioxydantes de l'HE d'orange valencia late, Test DPPH	122
Tableau 25 : Teneur des matières grasse*des OEL.....	123
Tableau 26 : Valeurs TBA (mg MDA/kg d'OEL) et inhibition I%* (valeurs entre parenthèses) des OEL qui contiennent de l'HE d'orange valencia late pendant le stockage en vitrine illumine réfrigéré.....	125
Tableau 27 : Les bactéries psychrotrophes (log₁₀ UFC/ml) dans les différents échantillons d'OEL durant un stockage en vitrine illuminée.....	127
Tableau 28 : Attributs sensoriels* d'odeur d'orange et <i>mauvaise odeur</i> mesurés sur OEL en présence d'HE d'orange valencia late, durant le stockage en vitrine illuminée.....	132
Tableau 29 : Indices de couleur CIE L*, a* et b* dans des OEL traitées avec HE d'orange valencia late.	134
Tableau 30 : Les Critères proposés pour l'estimation de la date d'expiration (duré de conservation ; vie) ** de OEL.....	136

Liste des figures

Figure 1 : Variété Eurêka.....	5
Figure 2 : Variété Bouquetier de Nice à fruit dur.....	7
Figure 3 : La bergamote.....	8
Figure 4 : Washington Navel.....	9
Figure 5 : Variété Valencia late.....	10
Figure 6 : Variété Tarocco.....	11
Figure 7 : Coupe transversale d'une orange (Hendrix et Redd, 1995 ; Guimaraes et al., 2010).....	13
Figure 8 : Schéma des différents Sfumatrices.....	21
Figure 9 : Photos à gauche d'une Pelatrice et à droite d'une centrifugeuse séparatrice de l'essence de citrus des eaux résiduelles.....	22
Figure 10 : Schéma représentatif de l'extraction par FMC in line.....	23
Figure 11 : Schéma représentatif de l'extraction par pression.....	23
Figure 12 : Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante (Cocorin et Guerin , 2003).....	25
Figure 13 : L'hydrodistillation industrielle.....	27
Figure 14 : Spectre électromagnétique.....	29
Figure 15 : Transferts thermiques sous chauffage conventionnel et micro-ondes.....	31
Figure 16 : L'extraction par solvant assistée par micro-ondes (ESMO).....	32
Figure 17 : Entraînement à l'air assisté par micro-ondes (EAMO).....	33
Figure 18 : Hydrodistillation assistée par micro-ondes sous pression réduite (VMHD).....	34
Figure 19 : L'hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDMO).....	35
Figure 20 : Extraction sans solvant assistée par micro-ondes (ESSAM).....	36
Figure 21 : Structures de BHT, BHA, TBHQ.....	46
Figure 22 : Structures d'acide ascorbique, tocophérol, palmitate d'ascorbyle et l'acide citrique.....	47
Figure 23 : Principe du test DPPH.....	49
Figure 24 : Formation du complexe chromogène par réaction de TBA et MDA (Antolovich, 2002).....	50
Figure 25 : Structure interne de l'œuf (Sauveur, 1988).....	53

Figure 26: Diagramme de fabrication des ovoproduits selon (Copin <i>et al.</i> , 1994 ; Galet <i>et al.</i> , 2010).....	60
Figure 27 : Schéma du montage expérimental de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes.....	72
Figure 28 : Schéma du montage d'hydrodistillation sur un appareil de Clevenger modifié...	75
Figure 29 : Espace chromatique CIE L*a*b*.....	86
Figure 30 : Proportion de la fraction oxygénée au sein de l'HE du l'orange valencia late après extraction selon trois méthodes.....	99
Figure 31 : Rotation des dipôles soumis à une irradiation micro-onde.....	108
Figure 32 : Diagramme de Pareto présentant l'influence standardisée de chaque effet.....	113
Figure 33 : Effets simples des paramètres.....	114
Figure 34 : Valeurs Observées en fonction des valeurs prédites.....	116
Figure 35 : Surfaces de réponses traduisant les effets combinés des paramètres sur le rendement en HE.....	118
Figure 36 : Effets d'interaction des paramètres opératoires sur le rendement.....	119
Figure 37 : % d'inhibition de DPPH (AA) des différentes concentrations de l'HE d'orange valencia late.....	120

Annexe

Annexe : Courbe d'étalonnage de TMP pour la détermination des teneurs totales en SR-TBA.

Liste des abréviations

AA	Activité anti-radicalaire.
AAI	Indice d'activité antioxydante.
AGPI	Acides gras polyinsaturés.
BHA	butylhydroxyanisole.
BHT	butylhydroxytoluène.
BOL	blanc d'œuf liquide.
CG/FID	chromatographie gazeuse munie d'un détecteur à ionisation de flamme.
CG/SM	chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
CP	expression à froid.
DL 50	dose létale 50%.
DPPH	1,1 Diphényl 2 Pycril Hydrazil.
EAMO	entraînement à l'air assistée par micro-ondes.
ESMO	extraction par solvant assistée par micro-ondes.
ESSAM	extraction sans solvant assistée par micro-ondes.
FAO	food and agriculture organization.
FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux.
FMC	Food Machinery Corporation.
GHz	giga Hertz.
ha	hectar.
HD	hydrodistillation.
Hdiff	hydrodiffusion.
HDMO	hydrodistillation assistée par micro-ondes.
HE	huile essentielle.
I	taux d'inhibition.
ISO	International standardisation organization.
ITAF	Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne.
JOL	jaune d'œuf liquide.
Kg	kilogramme.
kW	kilo watts.
MADR	ministère de l'agriculture et du développement rural.
MAE	microwave assisted extraction.
MAHD	Hydrodistillation assistée par micro-ondes.
MAP	microwave assisted process.
mbar	millibar.
MDA	malonaldehyde.
MEB	microscope électronique à balayage.
mg	milligramme.
MHG	Hydrodiffusion assisté par micro-ondes et gravité.
MHz	méga Hertz.
MO	micro-ondes.
MSD	entraînement à la vapeur assisté sous micro-ondes.
MSDf	vapo-diffusion Assistée par Micro-ondes.
NF	norme française.
OEL	œuf entier liquide.
PCA	plate acount agar
Qx	quintaux.
Rdt	rendement.

SD	entrainement a la vapeur.
SR TBA	Substances réactives avec le TBA Acide Thiobarbiturique.
TBHQ	tert-butylhydroquinone.
TMP	Malonaldehyde tétraméthyl acétal.
ufc/ml	unités de colonies formés / millilitre.
UV	ultraviolet.
VMHD	hydrodistillation par micro-ondes sous pression réduite.
µl	microlitre.
µg	microgramme.

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
I.SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
I.1. Les citrus	3
I.2. Les variétés de Citrus	4
I.2.1. Le Citronnier	5
I.2.2. Le Bigaradier.....	6
I.2.3. Le Bergamotier.....	7
I.2.4. L'oranger.....	8
I.3. Caractères spécifiques des Citrus	11
I.4. Les huiles essentielles et essences de Citrus	13
I.4.1. Composition chimique des essences et huiles essentielles de Citrus	14
I.4.2. Les procédés d'extraction des huiles essentielles de Citrus	19
I.4.2.1. L'expression à froid	19
I.4.2.2. Extraction par entraînement à la vapeur.....	24
I.4.2.3. Hydrodistillation	25
I.5. Extractions assistées par micro-ondes des huiles essentielles et des molécules aromatiques	28
I.5.1. Historique de l'extraction par micro-ondes.....	28
I.5.2. Principe du chauffage micro-ondes.....	29
I.5.3. Les procédés d'extraction assistés par micro-ondes.....	31
I.5.3.1 L'extraction par solvant assistée par micro-ondes (ESMO)	31
I.5.3.2. L'entraînement à l'air assistée par micro-ondes (EAMO)	33
I.5.3.3. L'hydrodistillation par micro-ondes sous pression réduite (VMHD)	33
I.5.3.4. L'hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDMO).....	34
I.5.3.5. L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (ESSAM)	35
I.5.4. Application de l'extraction micro-ondes dans les produits naturels	36
I.5.5. Paramètres régissant les extractions assistées par micro-ondes	39
I.5.6. Composition chimique	41
I.5.7. Effet des micro-ondes sur le matériel végétal	41
I.6. Activités biologiques des huiles essentielles	42
I.6.1. Activité anti microbienne des huiles essentielles	43
I.6.2. Activité anti oxydante des huiles essentielles	45
I.6.2.1. Antioxydants de synthèse et antioxydants naturels.....	46

I.6.2.2. Méthode d'évaluation de l'activité antioxydante	47
I.6.3. Toxicité des huiles essentielles	50
I.6.4. Application des huiles essentielles dans les industries alimentaires	51
I.7. Les œufs	51
I.7.1. Définition des œufs.....	51
I.7.2. Structure de l'œuf.....	52
I.7.3. Stockage des œufs coquilles.....	54
I.7.4. Production des œufs.....	54
I.7.5. Valeur nutritionnelle de l'œuf.....	55
I.7.6. Les ovoproduits	59
I.7.6.1. Définition des ovoproduits.....	59
I.7.6.2. Les ovoproduits liquides	61
I.7.7. Microbiologie des œufs.....	63
I.7.7.1. Les bactéries psychrotrophes	64
II. MATERIELS ET METHODES.....	70
II.1. Matériel végétal	70
II.2. Extraction des huiles essentielles.....	70
II.2.1. L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (ESSAM).....	70
II.2.2. L'extraction par hydrodistillation (HD).....	74
II.2.3. L'extraction par expression à froid (CP)	76
II.3. Analyse par Chromatographie en phase Gazeuse (CG) et Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM).....	77
II.4. Analyses physico-chimiques	80
II.4.1. Détermination du taux d'humidité.....	80
II.4.2. Rendement en huile essentielle Rdt HE.....	80
II.4.3. Mesure de la densité selon la norme NF T 75-111	80
II.4.4. Mesure de l'indice de réfraction selon la norme NF T 75-112.....	80
II.4.5. Mesure du pouvoir rotatoire : NF T 75-113.....	81
II.4.6. Teneur en matière grasse	81
II.4.7. Le pH	81
II.4.8. Evaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	82
II.4.8.1. Evaluation de la stabilité oxydative ; Test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique SR-TBA	82
II.4.8.2. Test au DPPH.....	83
II.4.9. Évaluation de la couleur	86
II.5. Effets biopreservateurs sur les OEL.....	87

II.5.1. Préparation des OEL (Matériel d'origine animale).....	87
II.5.2. Analyse des bactéries psychrotrophes dans OEL	88
II.6. Analyse sensorielle.....	88
II.7. Détermination de <i>shelf life</i> du produit.....	89
II.8. Analyses statistiques.....	89
III. RESULTATS ET DISCUSSION.....	92
III.1. EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES.....	92
III.2. Extraction de l'huile essentielle d'orange douce « valencia late ».....	92
III.2.1. Rendement d'extraction.....	92
III.2.2. Composition des huiles essentielles d'orange douce (Valencia late) obtenues par ESSAM, HD et CP	95
III.2.3. Constantes physiques.....	101
III.3. Détermination des phénomènes mis en jeu dans l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes	102
III.4. Analyse statistique	110
III.5. Activité antioxydante de l'huile essentielle d'orange douce Valencia Late	120
III.5.1. Test anti-radicalaire (DPPH*).....	120
III.5.2. Application dans les ovoproduits liquide	122
III.5.2.1. pH et teneur en matières grasses d'OEL.....	122
III.5.2.2. L'oxydation des lipides (Test SR-TBA)	123
III.6. Analyse microbiologique	126
III.7. Analyse sensorielle	130
III.8. Couleur des OEL	133
III.9. Vie utile du produit <i>shelf life</i>	135
CONCLUSION GENERALE	138
<i>Références bibliographiques</i>	<i>142</i>

Annexe

INTRODUCTION

L'extraction des huiles essentielles et des arômes, pour les industries de la cosmétique, de la parfumerie et de l'agroalimentaire, est réalisée via deux grandes techniques : la distillation azéotrope et l'extraction par solvant. Ces méthodes traditionnelles, éprouvées mais peu coûteuses, sont aujourd'hui remises en cause. Elles sont extrêmement consommatrices en énergie et en solvant. Ces derniers, généralement issus du pétrole, sont de plus en plus décriés pour leur impact sur la santé et l'environnement.

Parmi les technologies d'extraction les plus prometteuses, l'extraction par micro-ondes, est l'une des méthodes les plus récentes pour l'extraction de molécules d'intérêt avec un impact environnemental positif : moins d'énergie, de solvants et des eaux usées.

La technologie de l'extraction par micro-onde paraît être une alternative intéressante puisqu'elle autorise l'utilisation réduite de solvant, des temps de traitement plus courts, des rendements plus élevés et une meilleure sélectivité. Dans le contexte de «chimie et procédés durables »

L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes est l'une des plus récentes. Inspirée d'un ancien procédé de distillation dite « sèche » utilisé par les alchimistes arabes pour l'extraction des huiles essentielles, elle consiste en une distillation sèche à l'aide d'un alambic utilisant le soleil comme source de chaleur. L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (ESSAM) a été développée en remplaçant l'énergie solaire par un chauffage micro-ondes plus performant, plus spécifique et beaucoup moins polluant qu'un chauffage traditionnel.

L'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour rehausser le goût, aromatiser et colorer les aliments (**Aprotosoie et al., 2010**). D'autre part, les huiles essentielles possèdent des profils de composition chimique différents permettant de les utiliser comme agents naturels de conservation des aliments (**Holley et al., 2005**).

Ces dernières sont avérées un moyen très prometteur pour pallier les risques d'altérations causés par les microorganismes ou par l'oxydation des lipides. C'est dans

cette optique que s'articule une partie de la présente étude, dont les principaux objectifs visent la possibilité d'utilisation de l'huile essentielle de l'orange douce valencia late extraite par ESSAM comme agent naturel bioconservateur d'une matrice alimentaire d'origine animal cas des ovoproduits liquides frais (les œufs entiers liquides).

Ce manuscrit de thèse est composé de quatre parties :

- La première partie sera consacrée à l'étude bibliographique : portera sur les citrus , l'extraction par microondes, la théorie du chauffage par micro-ondes ainsi que les bases de l'électromagnétisme : nature et propagation des ondes, mécanisme de chauffage, interaction onde – matière, ainsi que les différents procédés d'extraction des huiles essentielles par la méthode micro-ondes, la spécificité induite par ce type d'extraction, l'activité biologique des huiles essentielles, et en fin des généralités sur l'œuf et les ovoproduits.

- La seconde partie sera réservée aux matériel et méthodes utilisées au cours de ce travail.

-La troisième partie sera destinée aux différentes résultats obtenus et discussion ; extraction des huiles essentielles des oranges d'Algérie (orange douce) par ESSAM et comparaison a deux techniques d'extraction conventionnelles, l'activité antioxydante des huiles essentielles d'orange ainsi l'application sur les œufs frais entier liquide et détermination de la durée de conservation (*shel-life*) des œufs frais entier liquide durant le stockage referegerée illuminée.

-Finalement, la dernière partie est réservée à la conclusion générale.

I.SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.I. Les citrus

L'histoire des agrumes (*Citrus*) d'après **Webber et al. (1967)** remonte à 4000 ans avant J-C. où le cédratier a poussé en Mésopotamie. La plupart des types d'agrumes sont originaires des grandes zones à climat tempéré autour des montagnes de l'Himalaya et du Sud-Est Asiatique. Ils ont été introduits dans le bassin méditerranéen par Alexandre le Grand à partir de sa grande invasion dans l'Inde. C'est pour cela qu'on les désigne également sous le nom d'Hespéridé qui provient du grec *Esperos* « le jardin où se trouvaient les fruits succulents ». Plus tard, les agrumes ont été introduits sur la côte est de l'Afrique par des échanges commerciaux qu'assuraient les califes arabo-musulmans. Leur entrée, en Amérique, s'est faite par les européens après sa découverte par Christophe Colomb. Selon **Benediste et Baches. (2002)** le mot «Agrume» quant à lui provient du latin *acrumen* qui désignait dans l'antiquité des arbres à fruits acides.

La culture des agrumes représente pour notre pays un segment stratégique. Selon les dernières statistiques (**MADR, 2011**), l'agrumiculture couvre actuellement une superficie totale de : 64 323 ha, soit environ 8 % de la superficie totale occupée par les cultures pérennes .La production totale avoisine les 1 100.000 tonnes toutes variétés confondues pour un potentiel de 1,5 à 2 millions de tonnes dès l'entrée en production des jeunes vergers et l'assainissement du vieux verger.

Le niveau de rendement moyen national enregistré (**2010 / 2011**) est de l'ordre de 172 qx/ha, bien qu'ayant bénéficié d'une évolution régulière (augmentation de 60 qx/ha depuis l'indépendance), il demeure insuffisant au regard des résultats obtenus par certaines agrumiculteurs de différentes régions du pays (de 300 à 400 qx/ha et même plus) en mettant en œuvre un itinéraire technique approprié.

La production mondiale actuelle de *Citrus* avoisine le chiffre de 121273,2 milliers de tonnes période **2013/2014 (FAO, 2015)**.

Les agrumes présentent une importance économique considérable en tant que culture de rapport dans de nombreux pays, en tant que produit d'exportation dans la plupart d'entre eux et enfin comme source d'emploi et d'activité économique, aussi bien dans

le secteur agricole que dans diverses branches auxiliaires (conditionnement, emballage, transformation, transport etc...).

Parmi les pays producteur du bassin méditerranéen, nous citons les plus importants : l'Espagne et l'Italie qui représentent à eux deux plus de 50% de la production de la région. Dans cet ensemble de pays producteurs d'agrumes, que représente l'Algérie !

Selon **FAO** L'Algérie a produit en **2014** ; **85642** tonnes de citron et limes et 955206 tonnes d'orange, le bassin méditerranéen est en tête pour la production d'oranges douces, d'oranges amères ; il partage la première place avec l'Asie pour les mandarines et avec l'Amérique du Nord pour les pamplemousses.

Si la région méditerranéenne offre des conditions excellentes pour la croissance des *Citrus*, l'Amérique du Nord peut également être considérée comme une grande région de culture pour ces arbustes, produisant un quart de la récolte mondiale de citrons, d'oranges douces et de mandarines (**Trovato, 1978**).

I.2. Les variétés de Citrus

Selon **Padrini et Lucheroni (1996)**, la classification des citrus est la suivante :

Règne : Plantae

Embranchement : Spermaphytes

Classe : Eudicotylédones

Ordre : Sapindales

Famille : Rutaceae

Genre : Citrus

Le genre *Citrus* est celui qui renferme le plus d'espèces et de variétés d'agrumes consommées, commercialisées et utilisées industriellement partout dans le monde : (**Praloran, 1971 ; Fleisher et Fleisher, 1991 ; Dung et al., 1996 ; Benediste et Baches, 2002**). Les plus importants sont :

- l'**oranger doux** *Citrus Sinensis*, natif du Sud-Est asiatique, qui s'est répandu dans la plupart des régions tropicales et subtropicales et dont les très nombreux cultivars occupent une place prépondérante dans le commerce et l'industrie ssssssssss fruits frais, jus de fruits, essences et parfums.

- le **bigaradier** *Citrus aurantium*, ou oranger amer dont on tire différentes essences (néroli, petit-grain, fleur d'oranger) et dont le fruit est utilisé en confiserie.
- la **bergamote** *Citrus Bergamia*, dont on extrait de l'acide citrique et une essence qui entre dans la fabrication de l'eau de Cologne. Parmi les autres *Citrus* importants, il faut signaler le cédratier *Citrus medica*, le citronnier *Citrus Limonum*, qui contient de fortes quantités d'acide citrique.
- la **lime** *Citrus Aurantifolia* aux fruits très acides (7 à 8% d'acide citrique), riche en vitamine C.

I.2.1. Le Citronnier

Craignant le froid mais aussi les températures trop élevées, le citronnier s'est développé dans les régions tempérées. Les climats caractérisés par des étés relativement frais et des hivers d'intensité moyenne favorisent les floraisons remontantes et leur nouaison et, par conséquent, la production de fruits est échelonnée sur toute l'année. C'est pour ces raisons que les principales régions productrices de citrons sont situées dans les zones côtières de la Sicile, de l'Espagne, de la Grèce et de la Californie du sud (Lota , 1999). Les fruits récoltés au stade de coloration « vert-jaunâtre, vert-clair ou vert-foncé » peuvent être conservés pendant 6 mois alors que ceux cueillis « jaunes » ne peuvent l'être que pendant quelques semaines.

Le groupe de citrons est constitué de plusieurs espèces : *Citrus limon* (L.) Burm. la plus riche en variétés appelées citrons vrais, *C. lumia* Risso & Poit., *C. meyeri* Y. Tan., *C. pennivesiculata* (Lush.) Tan., *C. jambhiri* Lush., *C. aurata* Risso, *C. pyriformis* Hassk., *C. assamensis* Dutta & Bhatt.

Parmi les nombreuses variétés de citron à pulpe acide, on trouve l'« Eurêka » originaire de Los Angeles (USA) d'un semis effectué en 1858 de graines de provenance italienne (Figure 1). L'arbre à port étalé est de taille et de vigueur moyenne. La floraison très remontante a tendance à produire des fruits au printemps et en été. Les fruits, généralement rassemblés en bouquet à l'extrémité des rameaux, sont de taille moyenne et ont quelquefois une peau un peu rugueuse (Praloran , 1971). La classification des citrons selon San Giuliano (1997) :

Genre : Citrus

Groupe : Citron

Espèces : *C. limon*, *C. lumia*, *C. sp*, *C. assamensis*, *C. aurata*, *C. jambhiri*,
C. meyeri, *C. pennivesiculata*.



Figure 1 : Variété Eurêka.

I.2.2. Le Bigaradier

Le bigaradier est passé successivement de la Chine vers l'Inde, l'Arabie et enfin l'Égypte. Son introduction en Europe s'est faite grâce aux Arabes qui l'introduisirent en Sicile au XI^{ème} siècle. Le bigaradier, dont le fruit est communément appelé « orange amère », est cultivé en Amérique Centrale et en Amérique du Sud ainsi que dans le bassin méditerranéen. Tanaka (**San Giuliano, 1997**) rassemble tous les bigaradiers au sein de quatre espèces :

Genre : Citrus

Groupe : Bigardier

Espèces : *C. aurantium*, **Variétés** : Apepu Brazilian Doux amer, Sae Algérie, Bouquetier de Nice à fruit dur, Menton, Santucci.

Espèces : *C. myrtifolia*, **Variétés** : Chinois à Grandes feuilles, Chinensis.

Espèces : *C. natsudaïdai*, **Variétés** : Natsudaïdai.

Espèces : *C. neo-aurantium*, **Variétés** : Tosu.

L'espèce *C. aurantium* est caractérisée par un grand nombre de variétés. Par contre, *C. neo-aurantium* Tan., *C. natsudaïdai* Hay. et *C. myrtifolia* Raf. ne sont composées que d'une à deux variétés. Bien que ressemblant assez étroitement à l'orange, le fruit du bigaradier se différencie par l'acidité de la pulpe et l'amertume prononcée de l'albêdo comme le montre la **Figure 2**.



Figure 2 : Variété Bouquetier de Nice à fruit dur.

I.2.3. Le Bergamotier

Le bergamotier (*Citrus bergamia* Risso & Poit.), la bergamote est le fruit du bergamotier **Figure 3**, est connu dans le bassin méditerranéen depuis le XVIII^{ème} siècle, à ne pas confondre avec la poire bergamote ou ses variétés L'origine génétique de la bergamote reste aujourd'hui incertaine. **Swingle (1967)** la considérait comme une variété du bigaradier (*C. aurantium* L.) tandis que Tanaka, en 1961, l'élevait au rang d'espèce (*C. bergamia* Risso & Poit.) (**Tanaka, 1961 ; Swingle et Reece , 1967**). Aujourd'hui, la plupart des auteurs considèrent le bergamotier comme un hybride. Cependant, ses parents encore méconnus sont l'objet de nombreuses controverses. Sur des critères pomologiques, le bigaradier est très probablement l'un des parents, le second pouvant être soit un limettier *C. aurantifolia* (Christm.) **Swingle (1967)**, soit un cédratier *C. medica* L. (**Chapot, 1962 ; Scora, 1988**).



Figure 3 : La bergamote.

I.2.4. L'oranger

L'oranger ou *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. est l'espèce du genre *Citrus* la plus importante, tant par le nombre de variétés qu'elle renferme, que par l'importance de ses productions. Pour **Tanaka**, la culture de l'Oranger se serait implantée en Chine vers le III^{ème} siècle après J. C. et l'Inde aurait ignoré son essence fruitière. Son introduction tardive à la fin du 16^{ème} siècle, dans le bassin méditerranéen est due aux Portugais, et cette espèce porte encore le nom des portugais, « bourtogan » en Arabe, « porthogal » en persan. Il existe plusieurs variétés dites « portugaise » sur la côte européenne de la Méditerranée. L'oranger est un agrume très décoratif, pouvant atteindre 10 mètres environ, avec un feuillage vert sombre persistant. Il nécessite une température moyenne de 14°C. Les fruits sont de forme et de coloration variable suivant les variétés, ce qui permet de classer les oranges en quatre groupes : les oranges blondes Navel, les oranges blondes, les oranges Sanguines et les oranges sans acidité.

Les oranges navels se différencient des autres par deux caractéristiques bien distinctes: la présence au sein de l'apex d'un petit fruit rudimentaire appelé « navel » et l'absence de pépins qui lui confère un grand intérêt commercial. « Washington » est

la variété la plus cultivée et la plus appréciée des consommateurs (**Figure 4**). Le fruit est relativement gros (200 à 250g) et de forme sphérique. Cette variété est appréciée pour sa précocité ; elle se récolte de novembre à février et fait l'objet d'un important commerce d'exportation (**Praloran, 1971**).



Figure 4 : Washington Navel.

La variété « Thomson » se distingue de Washington par une maturation plus précoce, (de 10 à 15 jours environ) et une peau plus fine. Ses fruits ont une chair plus grossière et moins juteuse. Surtout présente en Algérie et au Maroc, la culture de cette variété est en régression au profit de la Washington.

Le groupe des oranges blondes est composé d'une part des oranges blondes communes et, d'autre part, des oranges blondes fines. Les oranges blondes communes regroupent toutes les oranges communes multipliées traditionnellement par semis direct (non greffés). Leur culture reste limitée aux jardins familiaux car la présence de pépins et le petit calibre des fruits ne permettent pas d'assurer leur commercialisation vers les marchés d'exportation. Les oranges blondes fines regroupent les variétés sélectionnées pour la qualité des fruits (sans pépins), leur productivité et leur époque de production. Les variétés les plus cultivées en Méditerranée sont : Salustiana, Hamlin, Cedenera, Shamouti et Valencia late. Cette dernière est probablement la variété d'orange la plus cultivée dans le monde pour sa tardiveté (récolte d'avril-mai jusqu'en juin-début juillet)

et pour ses grandes facultés d'adaptation (**Figure 5**). Aux Etats-Unis, elle représente à elle seule, plus de la moitié de la production d'oranges (**Praloran , 1971**).



Figure 5 : Variété Valencia late.

Les Oranges sanguines ne se distinguent des blondes que par la présence des pigments anthocyaniques dans l'épiderme et la pulpe. Parmi les variétés les plus cultivées, on peut citer la variété « Double fine améliorée ». Le fruit est de forme allongée ; il a un poids moyen de 170 g, sa maturation s'effectue en hiver. La variété « Moro » est la plus précoce des oranges sanguines et certainement aussi la plus richement colorée en ce qui concerne la pigmentation de la pulpe qui est uniformément sombre violacé à maturité. Quant à la variété « Tarocco », le fruit est de grande taille, de forme ovale avec un col très caractéristique (**Figure 6**).

Les oranges sans acidité comme les limettes, limonettes et citrons doux sont insipides. Ce groupe possède quelques variétés « Impérial », « Réal », « Lima » qui sont surtout cultivées au Brésil, en Espagne, en Afrique du Nord et au Moyen Orient (**Praloran, 1971**).



Figure 6 : Variété Tarocco.

I.3. Caractères spécifiques des Citrus

Depuis plus de 300 ans, de nombreuses classifications botaniques furent créées dans le but de structurer le genre *Citrus*. Il existe à l'heure actuelle 1300 variétés attribuées à ce genre, et chaque variété porte diverses appellations. La classification des agrumes est un problème que les spécialistes s'accordent à qualifier de complexe. Des divergences en la matière se manifestent entre les opinions des taxonomistes tels que Swingle, Tanaka, Hume et Chapot (**Praloran, 1971**). En effet, l'absence d'une classification admise par tous provient non seulement des particularités de ce groupe mais aussi de la difficulté de réaliser une étude globale. La complexité taxonomique des agrumes s'explique également par de larges possibilités d'hybridation intra- et interspécifique générant de nouvelles espèces, par la polyembryonie qui peut fixer ces structures hybrides et par l'étendue de l'aire de culture où les structures génétiques auraient pu évoluer indépendamment par le biais des différentes pressions environnementales (**De Rocca Serra et Ollitrault, 1992**).

Deux grandes classifications existent et sont généralement utilisées pour le genre *Citrus* : celle du japonais **Tanaka (Praloran, 1971)** comprend 156 espèces tandis que celle de **Swingle et Reece. (1967)**, n'en distingue que 16. **Tanaka** élève au rang d'espèces de nombreux hybrides intra- ou interspécifiques et sa classification liste toutes les variétés d'agrumes existantes en lui attribuant son nom latin. Ceci a pour but de standardiser et d'identifier les nombreuses variétés fruitières d'agrumes. Les agrumes appartiennent à la famille des *Rutaceae*, sous famille des *Aurantioideae*, tribu des *Citreae* et sous-tribu des *Citrinae* (**De Rocca Serra et Ollitrault, 1992**). Dans

cette dernière, on distingue trois groupes dont les agrumes vrais et parmi ceux-ci, les trois genres botaniques les plus connus : *Citrus*, *Poncirus* et *Fortunella*.

Le genre *Poncirus* ne contient qu'une espèce *Poncirus trifoliata*. Elle présente des fruits impropres à la consommation mais sa grande résistance au froid lui confère des propriétés intéressantes en qualité de porte-greffe. Le genre *Fortunella* comprend deux à quatre espèces désignées sous le nom commun de « Kumquats » et servant essentiellement à la fabrication de fruits confits. Le genre *Citrus* est constitué d'un large éventail d'agrumes dont les principaux sont les oranges, les mandarines, les clémentines, les citrons, les limes, les cédrats, les pomelos, les pamplemousses, les bigaradiers et les bergamotes.

Les *Citrus* sont des arbustes de couleur verte, de longueur variant de 3 à 15 m et dont le bois est très dur. A l'aisselle des pétioles ailés peuvent apparaître deux épines obtuses ou aiguës. Les fruits sont de couleur vive, généralement jaune ou orange, leur chair est composée de vésicules à jus ou pulpe. L'écorce du fruit contient des poches sécrétrices contenant des essences pouvant être extraites selon différents procédés. Leur taille est également très variable et leur poids peut atteindre un kilogramme. Le mésocarpe, en général assez épais par rapport à la taille du fruit, peut en constituer la plus grande partie. Il renferme dans sa partie externe le flavedo (8 à 10% du fruit) coloré par des pigments caroténoïdes et l'albédo (30% du fruit) qui est une couche blanche et spongieuse plus ou moins épaisse.

Selon le type d'agrumes, l'épicarpe et le mésocarpe adhèrent plus ou moins fortement à l'endocarpe. Ainsi, à maturité, le zeste de la mandarine est totalement séparé de l'endocarpe. Ce dernier est formé de quartiers remplis de vésicules, gorgés de jus, il est appelé «pulpe», représentant 40 à 45% du fruit comme le montre la **Figure 7** Les matières insolubles sont estimées de 20 à 30% du fruit (**Blondel, 1978**). A la surface des fruits dans l'écorce se trouvent les glandes oléifères remplies d'huiles essentielles. La coupe transversale du fruit permet de distinguer les parties suivantes (**Figure 7**) :

- Une peau ou une écorce plus connue sous le nom d'épicarpe (ou *flavedo*),
- Un mésocarpe (ou *albedo*) blanc, épais et spongieux, qui forme avec l'épicarpe, le péricarpe ou peau du fruit.

- segments de pulpe (carpelle) où se concentre le jus (avec ou sans pépins selon les variétés) .
- une enveloppe radiale épaisse (ou endocarpe). Cette partie, riche en sucres solubles, renferme des quantités significatives de vitamine C, de pectine, de fibres, de différents acides organiques et de sel de potassium, qui donnent au fruit son acidité caractéristique (Hendrix et Redd, 1995 ; Guimaraes et *al.*, 2010).

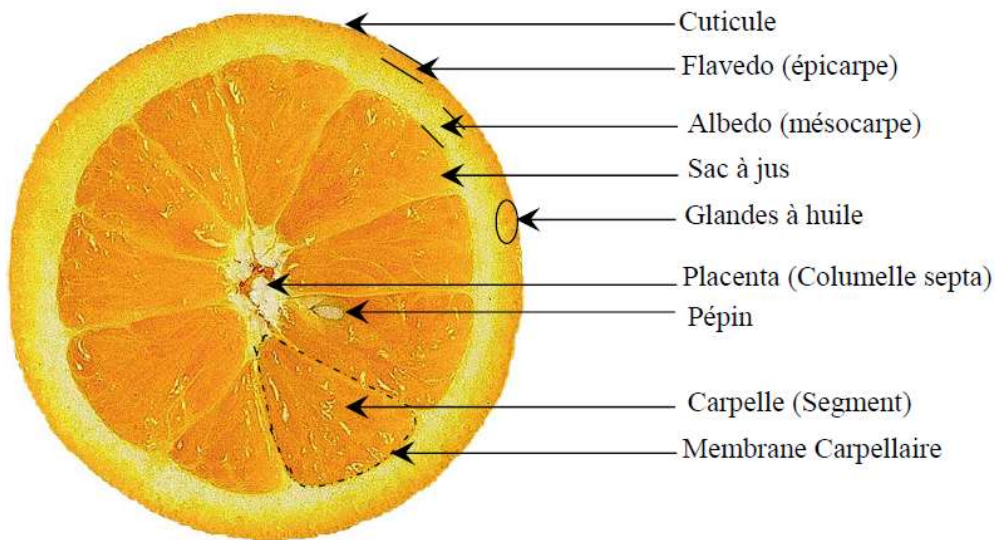


Figure 7: Coupe transversale d'une orange (Hendrix et Redd, 1995 ; Guimaraes et *al.*, 2010).

I.4. Les huiles essentielles et essences de Citrus

Les fleurs par distillation vont donner de l'huile essentielle de néroli parmi les plus chères du marché des huiles essentielles et les plus demandées en parfumerie pour l'introduire en note de cœur dans les parfums féminins. La distillation génère un sous-produit « l'eau de fleur d'oranger » qui est très utilisé en agroalimentaire aussi bien dans l'industrie que pour la consommation des ménages. Il faut noter que seule l'eau issue de la distillation a le droit à l'appellation « eau de fleur d'oranger », la plupart des contrefaçons bon marché trouvées dans les commerces, mélanges d'eau et d'arômes de synthèse, n'ont droit qu'à l'appellation « arôme de fleur d'oranger ».

Selon **Bernard et al. (1988)**, le nom d'essences ou huiles essentielles désigne les principes volatiles généralement odoriférants synthétisés par l'organisme végétal. Ces composés ont la propriété de se solubiliser dans les huiles et les graisses. Par conséquent, ils ont reçu empiriquement le nom d'huile essentielle. Le terme « huile » souligne le caractère visqueux et hydrophobe de ces substances et le terme « essentielle » désigne la caractéristique principale de la plante à travers ses exhalaisons.

L'association française de normalisation (**AFNOR, 2000**) définit une huile essentielle comme étant un produit obtenu à partir d'une matière végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques, soit par distillation à sec à partir de l'épicerpe des Citrus. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques.

I.4.1. Composition chimique des essences et huiles essentielles de Citrus

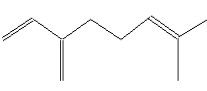
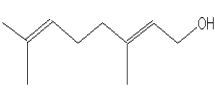
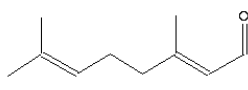
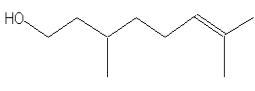
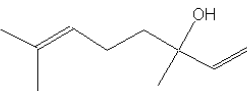
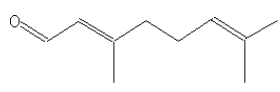
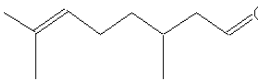
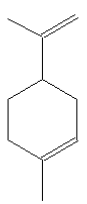
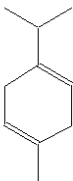
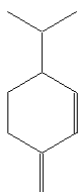
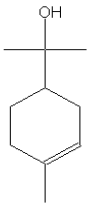
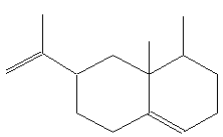
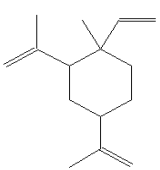
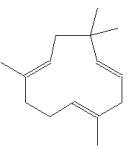
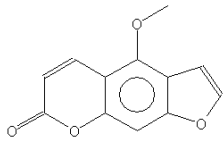
La nature des composants aromatiques ainsi que leur proportion en huile essentielle diffèrent d'une espèce à l'autre. Une huile essentielle ou une essence est composée de multiples constituants ; par exemple, l'essence de bergamote est composée de 135 composés chimiques différents (**Cocorin et Guerin, 2003**). Les huiles essentielles de *Citrus* contiennent une proportion relativement importante d'hydrocarbures terpéniques, dont le plus abondant est le limonène alors qu'il ne participe que peu à l'arôme. Par contre, l'arôme est dû à des aldéhydes, alcools ou esters terpéniques, à des aldéhydes aliphatiques et parfois à de l'anthranilate de méthyle. Les essences obtenues par expression à froid renferment de plus des constituants non volatils comme les coumarines.

Les essences de *Citrus* possèdent de nombreux dérivés dont la nature et la présence dans l'essence varient d'une espèce de *Citrus* à une autre **Tableau 1**. Ces dérivés appartiennent à cinq grands groupes de substances :

- dérivés terpéniques : monoterpènes et sesquiterpènes.
- dérivés hydroxylés : alcools aliphatiques, alcools terpéniques
- constituants carbonylés : aldéhydes, cétones
- acides et esters : acides aliphatiques, acides terpéniques, esters
- dérivés de la benzopyrone : coumarines, furo-coumarines, flavones.

L'essence d'orange douce et de pamplemousse possèdent respectivement 96,5% et 92,5% d'hydrocarbures terpéniques dont 95% de limonène. L'essence de bergamote a un pourcentage beaucoup plus faible en dérivés terpéniques : 38,5% dont 25% de limonène. Les alcools terpéniques constituent 22,5% de l'huile essentielle, avec 20% de linalol. C'est l'acétate de linalyle (un ester) qui, avec un pourcentage élevé (30%), peut sans conteste être considéré comme le principal élément de l'essence de bergamote. L'essence de néroli bigarade a une composition chimique très voisine de celle de l'essence de bergamote : 35% de dérivés terpéniques, 30% de linalol, 4% d'esters. Le linalol est également présent de façon notable dans les autres essences d'agrumes : 0,5% dans l'orange douce, 2% dans la mandarine et 5% dans l'orange amère. Les autres essences d'agrumes possèdent également, en faible quantité, des dérivés de la benzopyrone comme le citoptène (5,8-diméthoxy-coumarine) et le bergaptène (5-méthoxypsoralène) selon **Praloran. (1971)**.

Tableau 1 : Principaux constituants des essences et huiles essentielles de citrus.

Monoterpènes			
		 Géranial	 Citronellool
 Linalol		 Néral	 Citronellal
 Limonène	 γ terpinène	 β phélandrène	 α terpinéol
Sesquiterpènes			Coumarines
 Valencène	 β élémène	 α humulène	 Bergaptène

I.4.1.1. L'huile essentielle de citron

De façon générale, on peut dire que l'essence de citron est composée de 92 à 93% de terpènes dont le *d*-limonène est le plus abondant. Le parfum est surtout déterminé par les éléments oxygénés dont le citral ou le gèranial C₁₀H₁₆O à raison de 3 à 5% et le citronellal C₁₀H₁₈O (**Goris *et al.*, 1949**). Le développement des techniques modernes d'analyses a permis de déceler dans l'essence de citron plus de 341 composés volatils. Des différences significatives peuvent être appréciées lors de l'examen comparatif d'essences d'origines diverses, soit en ce qui concerne les concentrations relatives de certains composants, soit aussi par la présence de certains composés spécifiques (**Jumenter, 1984**).

I.4.1.2. L'huile essentielle du Bigaradier

Dans l'essence d'orange amère, le *d*-limonène est le plus abondant. Comme pour toutes les essences, ce sont les composants oxygénés qui sont responsables de leur parfum caractéristique (**Praloran, 1971**). La composition chimique de l'huile essentielle du bigardier montre la présence de :

• Terpènes (<i>d</i> -limonène)	92%
• Alcools libres (Linalol, Terpinéol)	0,37%
• Aldéhydes (nonylique, décyclique, dodécyclique)	0,78%
• Esters (acétate de linalyle 1%)	2,10%
• Phénols	0,09%
• Sesquiterpènes (non identifiés)	0,03%
• Acides libres (formique, acétique, cinnamique)	0,05%

I.4.1.3. L'huile essentielle d'orange douce

L'essence d'orange douce possède une teneur en hydrocarbures monoterpéniques que l'on peut évaluer à environ 90%. Le composant dominant de la fraction monoterpénique est le *d*-limonène, suivi de loin par le myrcène, le sabinène et l' α -pinène. Les composants oxygénés sont responsables du parfum caractéristique de l'essence avec notamment l'aldéhyde décyclique qui a une odeur d'orange. Une liste non

exhaustive des constituants rencontrés dans l'essence d'orange est présentée dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Les composants rencontrés dans l'essence d'orange douce (Di Giacomo, 1974).

Terpènes	Aldéhydes et Cétones	Caroténoïdes
myrcène	aldéhyde formique	phytoène
d-limonène	aldéhyde acétique	phytofluène
terpinolène	aldéhyde capronique	α -carotène
α - terpinène	aldéhyde énantique	β -carotène
β -terpinène	aldéhyde caprilique	cryptoxanthine
γ - terpinène	aldéhyde pèlargonique	lutéïne
α - phellandrène	aldéhyde caprique	zéaxanthine
β - phellandrène	aldéhyde décyclique	β -citaurine
α - thujène	aldéhyde laurique	réticulotaxanthine
sabinène	aldéhyde nonylique	valencianaxanthine
Δ_3 carène	citronellal	violaxanthine
α - pinène	néral ; Nootkatone	lutéoxanthine
β - pinène	gèranial ; Sinensal	auroxanthine
camphène	acétone ; Méthyl hepténone	sinensianaxanthine
p-cymène ; 2,4-p-Menthadiène	pipériténone ; Carvone	valenciacrome
Sesquiterpènes	Acides	Coumarines
β -farnésène	acide acétique	citroptène
β -elémène	acide formique	mèranzine
α -humulène	acide proprionique	bergaptol
β -humulène	acide butyrique	auraptène
Δ -cadinène	acide isovalèrianique	isoimpèratorine
caryophyllène	acides gras saturés (de C ₆ à C ₂₈)	tangèrétine
α -copaène	acides gras monoinsaturés C ₁₆ , C ₁₈ , C ₂₀	nobilétine
β -copaène		espèrétine
α -cubébène		sinensétine

valencène	acides gras polyinsaturés (C ₁₈ : 2 et C ₁₈ : 3	bergaptène
Alcools	Esters	Divers
citronellol ; linalol géraniol ; nérol terpinène-4-ol ; α - terpinéol isopulégol trans-carvéol ; cis-carvéol bornéol ; farnésol élémol ; nérolidol 1- <i>p</i> -mentène-9-ol alcool méthylique, éthylique, propylique, butylique, isobutylique, amylique, isoamylique, heptylique, esylique, octylique, nonylique, décylique, undécylique, dodécylique, cérylique	butyrate d'éthyle capronate d'éthyle capronate de méthyléthyle caprilate d'éthyle caprilate de nonyle acétate d'octyle acétate de nonyle acétate de décyle acétate de citronellyle acétate de géranyle acétate de néryle acétate de terpényle acétate de linalyle formiate de terpényle acétate de bornyle	linalyle-oxyde, cis linalyle-oxyde, trans furfurol β -sitostérol fridéline citrostadiénol anthranilate de méthyle

I.4.2. Les procédés d'extraction des huiles essentielles de Citrus

I.4.2.1. L'expression à froid

La pression à froid est le moyen le plus simple mais aussi le plus limité. Cette technique d'extraction est utilisée pour obtenir des essences d'agrumes contenues dans les zestes. Les huiles essentielles d'agrumes sont les seules à être extraites par le procédé d'expression à froid, qui est basé sur la rupture des parois des sacs oléifères ; cette essence est ensuite entraînée par un courant d'eau froide. Une émulsion constituée d'eau et d'essence se forme. L'essence est alors isolée par décantation. Diverses

techniques manuelles ou mécaniques, traitant le fruit entier ou seulement les écorces, sont utilisées.

Autrefois, les fruits étaient frottés manuellement sur des parois garnies de picots d'une écuelle de bois. L'huile exprimée était recueillie à l'aide d'une éponge. Elle était ensuite soigneusement filtrée. Quatre à cinq heures sont nécessaires pour traiter une centaine de kilo d'écorces, sans compter les pertes de rendement

Afin d'augmenter le rendement et de réduire les coûts, de nombreux essais ont été effectués pour mécaniser le procédé. En 1908, **Perroni-Paladini** suivi de **Lo Castro**, Marisca et, plus tard, Spéciale et Indelicato ont inventé des machines ayant une capacité de traitement supérieure (environ 1 tonne/heure). De concepts mécaniques différents, ces machines consistent en deux rouleaux sur lesquels tourne une chaîne spéciale, avec des éléments déformables. Après extraction du jus par "birillatrice", les écorces sont entraînées en tournant entre la chaîne et un plateau horizontal nervuré fixe. Des jets d'eau permettent de récupérer l'essence et l'émulsion est ensuite centrifugée. Ces machines (**Figure 8**) sont appelées « Sfumatrice ». En appliquant des systèmes plus performants, Spéciale et Indelicato ont mis au point de nouvelles machines telles que la "Super-Sfumatrice" et, plus récemment "AZS-204 " permettant l'extraction automatique et simultanée du jus et de l'huile essentielle, avec des capacités supérieures à 2 tonnes/heure. Le fruit est coupé en deux par une lame fixe et les moitiés tombent dans des coupelles dans lesquelles elles sont pressées par des têtes rotatives pour récupérer le jus. Elles sont ensuite entraînées entre un rouleau et un plateau fixe où l'essence est récupérée avec des jets d'eau. L'émulsion eau - essence est séparée par centrifugation (**Dugo et Di Giacomo, 2002**).

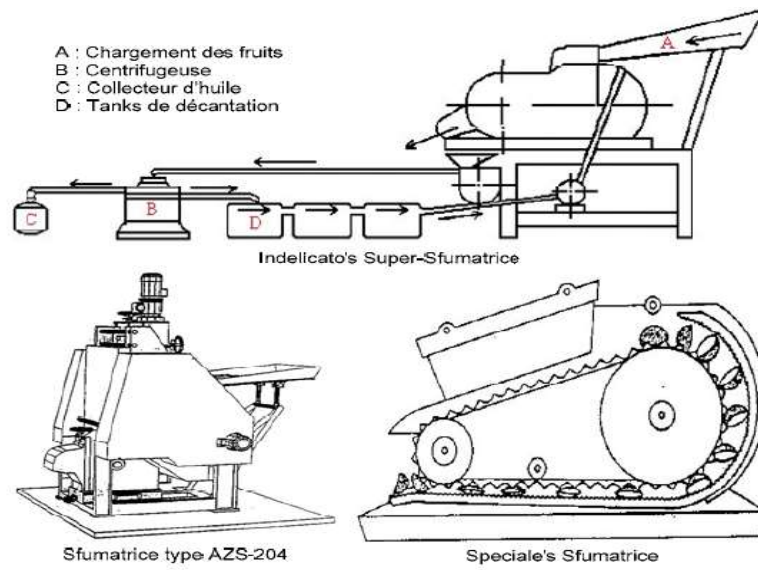


Figure 8 : Schéma des différents Sfumatrices.

Poursuivant leurs travaux de recherches pour améliorer l'extraction de l'essence à partir du fruit entier, Ando, Avena, et plus récemment Speciale et Indelicato, ont développé une nouvelle méthode d'extraction appelée « Pelatrice » largement diffusée dans le monde (**Figure 9**). Les fruits sont envoyés dans une machine comportant trois couples de rouleaux en acier inoxydable percés de trous comme une râpe, tournant en sens contraire et forçant les fruits à tourner sur eux-mêmes afin d'en râper toute l'écorce. Des jets d'eau récupèrent l'essence formant une émulsion. Celle-ci est séparée puis clarifiée dans plusieurs centrifugeuses (**Kimball, 1999 ; Dugo et Di Giacomo, 2002**).



Figure 9 : Photos à gauche d'une Pelatrice et à droite d'une centrifugeuse séparatrice de l'essence de citrus des eaux résiduelles.

La société américaine FOOD MACHINERY CORPORATION (F.M.C.), est ensuite arrivée sur le marché avec sa "FMC- IN-LINE", qui extrait simultanément le jus et l'essence (**Figure 10**). Les extracteurs sont équipés de quatre têtes d'extraction, chacune d'elles étant constituée d'un bol inférieur et d'un bol supérieur mobile qui compriment le fruit. Des couteaux supérieurs et inférieurs tranchent le fruit pendant le mouvement de descente du bol supérieur. Le jus est ainsi pressé dans un tuyau tamiseur qui se comprime pendant le mouvement ascendant synchronisé du tuyau d'écoulement. Parallèlement, l'essence obtenue est écoulee latéralement lorsque les cellules du zeste (flavedo) éclatent lors de la descente du bol supérieur (**Kimball, 1999**).

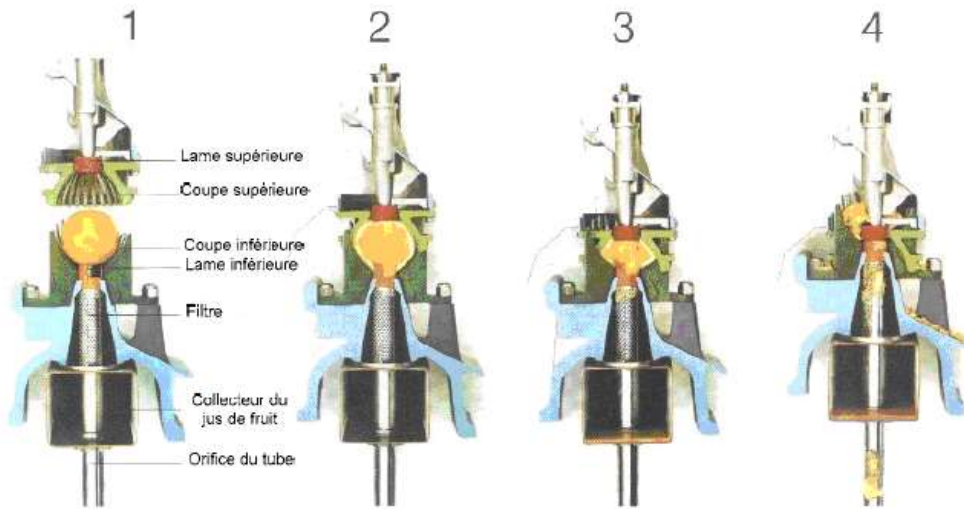


Figure 10 : Schéma représentatif de l'extraction par FMC in line.

Il convient de mentionner une autre technique utilisée avec succès par l'industrie. Elle consiste en deux vis qui forcent les écorces à libérer l'essence à une pression donnée (Figure 11). L'émulsion est envoyée dans un filtre-presse pour éliminer les principaux résidus (Dugo et Di Giacomo, 2002).

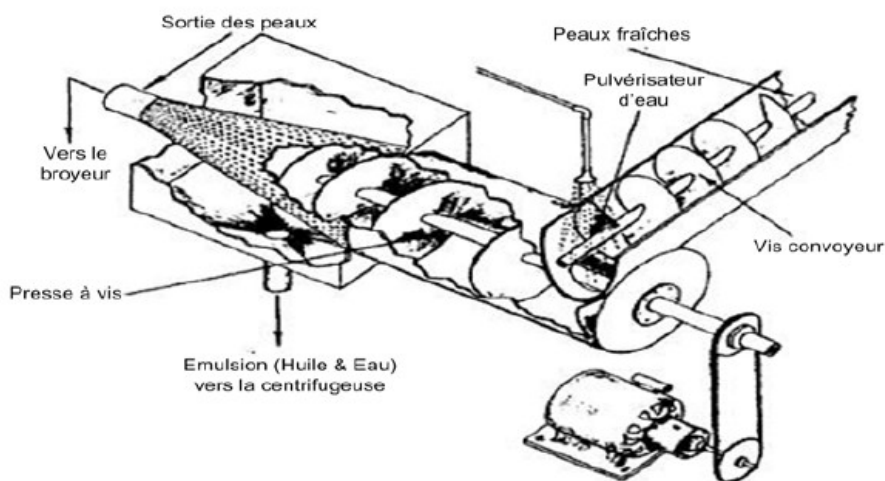


Figure 11 : Schéma représentatif de l'extraction par pression.

I.4.2.2. Extraction par entraînement à la vapeur

Il est important aussi de bien faire la distinction entre le terme « huile essentielle », issue de l'entraînement à la vapeur et le terme « essence » issu de l'extraction par l'expression à froid. Cette dernière est chimiquement identique à l'essence naturelle contenue dans les poches oléifères de l'écorce du fruit, tandis que l'huile essentielle est l'essence transformée par la chaleur du procédé de distillation. Basé sur le fait que la plupart des composés volatils odorants sont susceptibles d'être entraînés par des aérosols de vapeur d'eau du fait de leur point d'ébullition relativement bas et de leur caractère hydrophobe (**Cocorin et Guerin , 2003**).

La distillation par entraînement à la vapeur est une technique utilisable pour certains agrumes, et est réalisée dans certains pays uniquement. Pour la commercialisation des huiles essentielles d'agrumes distillées, le procédé d'extraction doit donc figurer sur le flacon, étant donné que la composition chimique est différente de celle exprimée à froid. Les parties de plantes utilisées (écorce, fruit entier) sont déposées sur des grilles dans un récipient appelé alambic, sans que le matériel végétal ne soit en contact avec l'eau. La vapeur d'eau produite par une chaudière traverse les fruits. Ainsi les huiles parfumées contenues dans ces fruits se mélangent à la vapeur d'eau. Celle-ci s'élève alors et entraîne avec elle les parfums. Elle quitte la chaudière en passant dans un col de cygne puis dans un serpentín glacé. Au contact du froid, la vapeur parfumée se condense et devient liquide. Ce liquide qui est donc formé d'un mélange d'eau et d'huile parfumée tombe dans un vase florentin. L'huile essentielle est ensuite isolée et récupérée par décantation. La **Figure 12** présente les deux principes d'extraction par entraînement à la vapeur descendante et ascendante.

L'hydrodiffusion est une des variantes du procédé d'extraction à la vapeur d'eau, mais elle n'est que rarement utilisée par certains producteurs pour obtenir une qualité spécifique des huiles essentielles selon la demande des parfumeurs (**Meyer et Warnod, 1984**). Le principe de l'extraction est basé sur l'action descendante d'un flux de vapeur sur le végétal, par utilisation de la pesanteur, pour extraire et condenser le mélange « vapeur d'eau – huile essentielle » dispersé dans la matière végétale, ce qui permet un gain de temps d'extraction et une économie d'énergie.

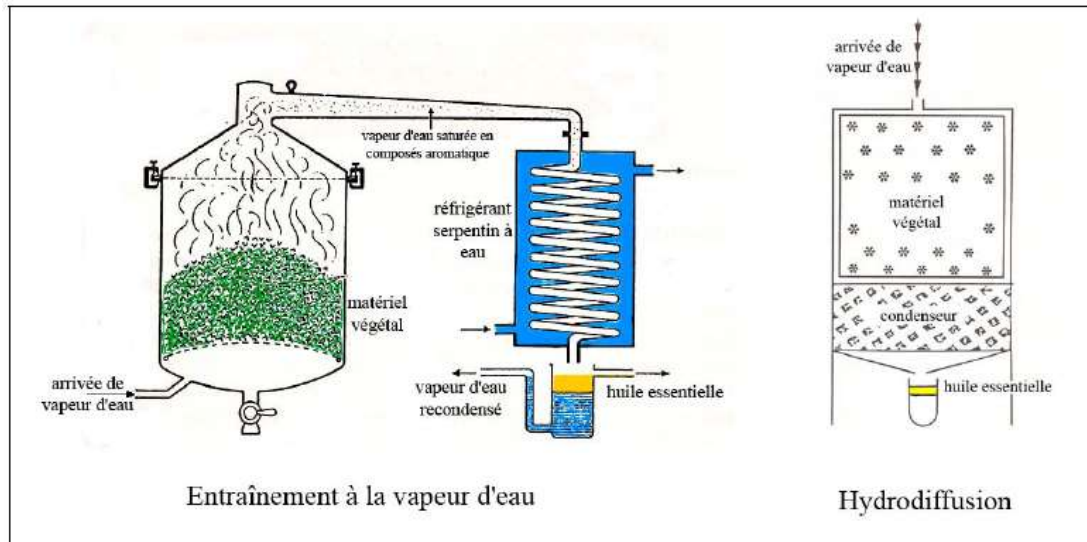


Figure 12 : Entraînement à la vapeur d'eau ascendante et descendante (Cocorin et Guerin , 2003).

Cette technique d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau présente différents avantages. On peut recueillir les essences de manière fractionnée en récupérant et séparant régulièrement les huiles essentielles pendant l'extraction. Ceci est très important pour les huiles essentielles ayant une valeur marchande différente selon qu'elles proviennent du début ou de la fin de la distillation. De plus, l'addition d'une pompe à vide permet d'opérer sous pression réduite lorsqu'une élévation de température vers 100° C risque de dégrader certains constituants fragiles. Sa mise en œuvre facile et l'utilisation de la vapeur d'eau, disponible à bas prix, comptent parmi ses avantages. Par ailleurs, pendant l'entraînement à la vapeur d'eau, la matière végétale est exposée à une température élevée et à l'action chimique de l'eau, et dans ces conditions la fragilité thermique des constituants de l'huile ou l'hydrolyse de certains d'entre eux conduisent à la formation d'artéfacts.

1.4.2.3. Hydrodistillation

La distillation à la vapeur, ou l'hydrodistillation demeure la technique la plus utilisée pour la production d'huile essentielle et elle reste sans doute la plus rentable, compte tenu de l'investissement matériel relativement peu important par rapport à celui des autres techniques et de l'utilisation du bois comme combustible parfois gratuit pour

les agriculteurs. Le procédé correspond à une distillation hétérogène, et consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition, généralement à pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement du lieu de sécrétion et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau un mélange azéotropique. Sachant que la température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation, elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures.

Les usines de faible production utilisent cette méthode pour retirer les huiles essentielles des fleurs, des feuilles ainsi que des petits rameaux de diverses variétés de *Citrus*. Une distillation permet d'obtenir de l'essence de néroli, ainsi que de l'eau de fleur d'oranger dont on peut retirer de l'absolue de fleur d'oranger grâce à une extraction par un solvant volatil tel que l'hexane ou l'éther de pétrole (Laruelle, 1993).

L'opération s'effectue dans un alambic en cuivre où les parties de plante à extraire sont recouvertes d'eau tiède et laissées ensuite en macération durant quelques heures. La température à l'intérieur de l'alambic est ensuite élevée progressivement jusqu'à 100°C. La vapeur d'eau produite entraîne les huiles essentielles avec elle, puis elle se condense dans un serpentin à l'extrémité duquel le distillat est recueilli dans un récipient, type vase florentin. Ce distillat se décante en deux parties, l'huile essentielle se trouvant dans la partie supérieure et la partie inférieure étant constituée par de l'eau. L'hydrodistillation peut s'effectuer avec ou sans recyclage de la phase aqueuse obtenue après séparation de l'huile essentielle lors de la décantation. Le principe de recyclage est communément appelé cohobage. La **Figure 13** présente le système industriel d'hydrodistillation. Au laboratoire, le système de référence pour l'extraction des huiles essentielles est le Clevenger publié en 1928, équipé d'un ballon pour la distillation d'eau et de la matière végétale, d'un condenseur, d'une colonne de récupération et de décantation d'huile essentielle et d'une cohobe (Clevenger, 1928).

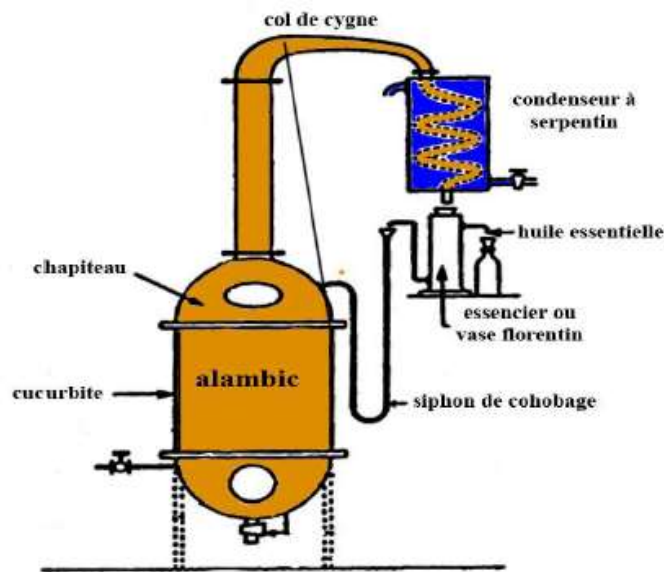


Figure 13 : L'hydrodistillation industrielle.

En plaçant dans l'alambic le même poids d'eau que de fleurs puis en maintenant une ébullition afin de procéder à une infusion prolongée, on obtient l'essence de néroli bigarade avec un rendement d'1 gramme d'huile essentielle pour 1 kg de fleurs. Si on procède avec 150 litres d'eau pour 100 kg de fleurs placés dans l'alambic, puis en amenant rapidement l'ensemble à ébullition, on obtient l'essence et de l'eau de fleur d'oranger (**Baud, 1951**). Elle est appelée aussi hydrolat de fleur d'oranger ou eau de naphé (**Praloran, 1971**). A partir des feuilles ou des rameaux du mandarinier, du citronnier ainsi que de l'oranger, on obtient par distillation l'essence de petit-grain (**Miquey, 1995**). L'origine du terme « petit-grain » est peu claire, mais il semble certain que, dans un premier temps, il se rapportait uniquement à de petits fruits pas mûrs et c'est seulement plus tard qu'on utilisa les autres parties comme les rameaux et les feuilles.

I.5. Extractions assistées par micro-ondes des huiles essentielles et des molécules aromatiques

Les huiles essentielles et les arômes extraits à partir des herbes aromatiques et des épices sont le résultat d'un mélange complexe de substances volatiles. Ils sont généralement présents à de très faibles concentrations dans les plantes à parfum. Avant de pouvoir utiliser ou analyser de telles substances, il est nécessaire de les extraire de leur matrice. Plusieurs méthodes d'extraction ont été mises au point telles que l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur, l'hydro-diffusion et la distillation-extraction simultanée. Cependant les composés volatils sont connus comme étant thermo-sensibles et vulnérables aux réactions chimiques. La perte de certains constituants, la dégradation de certains composés insaturés par effet thermique ou par hydrolyse, ainsi que la présence de résidus de solvants organiques plus ou moins toxiques peuvent être engendrés par ces techniques d'extraction. Ces désavantages ont attiré l'attention de plusieurs laboratoires de recherche et ont permis la mise au point de nouvelles techniques d'extraction des huiles essentielles et d'arômes beaucoup plus écologiques utilisant des solvants moins toxiques et en moins grande quantité. Parmi ces nouvelles techniques figurent : l'extraction par fluide supercritique, la détente instantanée contrôlée, l'extraction par solvants sous pression, la flash détente, l'extraction par ultrasons et l'extraction assistée par micro-ondes.

I.5.1. Historique de l'extraction par micro-ondes

Depuis 1986 avec les travaux de Ganzler et coll. (**Ganzler *et al.*, 1986**), l'extraction assistée par micro-ondes a connu de profonds changements. A l'heure où « rapidité », « efficacité », et « sélectivité » sont devenus les caractéristiques principales d'une bonne technique d'extraction, les travaux sur l'extraction assistée par micro-ondes ne cessent de croître et les nouvelles techniques de fleurir. La chimie analytique a permis ces dernières années de réduire considérablement les temps d'analyse grâce au développement des techniques chromatographiques en partie. La chimie préparative, telle que l'extraction solide-liquide à laquelle nous nous intéressons dans le cadre de l'extraction de molécules aromatiques volatiles issues de matières végétales, se devait de réduire elle aussi ces durées, tout en conservant son efficacité et sa sélectivité. Les micro-ondes ont apporté une solution de choix. Grâce à un chauffage sélectif, sans inertie et rapide, les micro-ondes combinées à des techniques d'extraction

classique ont permis de remédier aux problèmes des temps d'extraction souvent trop longs.

I.5.2. Principe du chauffage micro-ondes

Les rayonnements micro-ondes ou hyperfréquences sont des ondes électromagnétiques qui se propagent dans le vide à la vitesse de la lumière. Elles sont caractérisées par une fréquence comprise entre 300 MHz et 30 GHz, c'est-à-dire par une longueur d'onde comprise entre 1 m et 1 cm. Sur le spectre électromagnétique (**Figure 14**), elles sont situées entre les radiofréquences et les infrarouges (**Kingston et Haswell, 1997**).

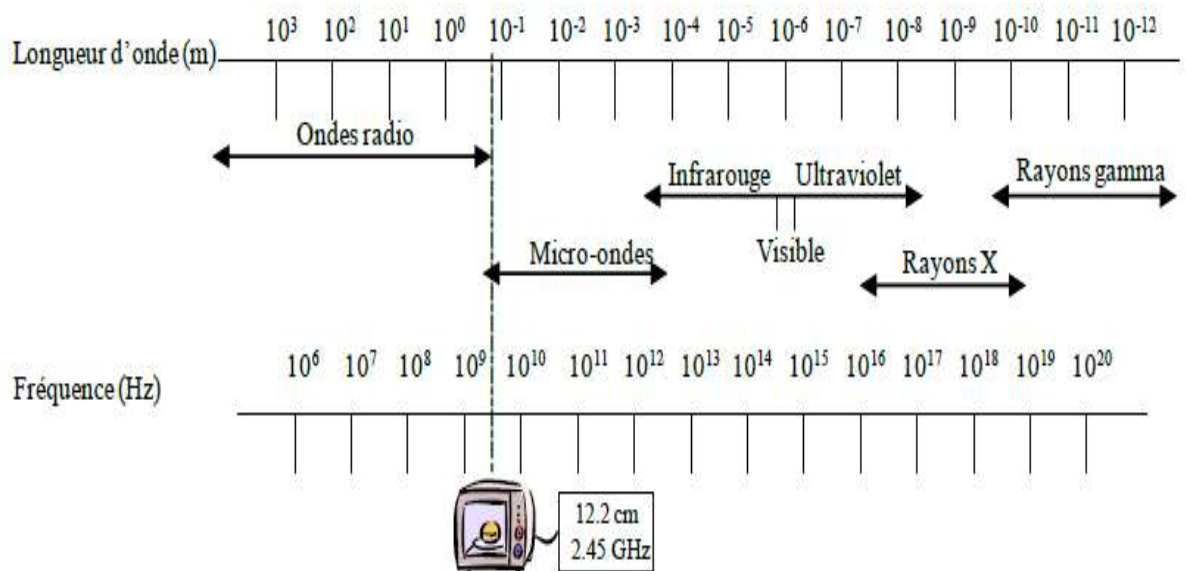


Figure 14 : Spectre électromagnétique.

La fréquence la plus utilisée est de 2450 MHz, ce qui correspond à une longueur d'onde dans l'air de 12,2 cm. Le mécanisme du chauffage micro-ondes repose sur le fait que les molécules polaires, telles que l'eau, ont des extrémités négatives et positives : ce sont des dipôles. En l'absence de champ électrique, les dipôles se trouvent orientés au hasard. Sous l'effet d'un champ électrique continu, les molécules tendent à s'orienter

dans la direction du champ électrique. Sous l'effet d'un champ électrique alternatif de fréquence f , les dipôles s'orientent dans la direction du champ sur une demi alternance, se désorientent lorsque le champ s'annule et se réorientent dans l'autre sens pendant la seconde demi alternance : c'est la rotation dipolaire.

L'énergie électrique est convertie en énergie cinétique par cette rotation dipolaire. L'énergie cinétique est ensuite transformée partiellement en chaleur. L'alignement des dipôles par rapport au champ électrique est contrarié par les forces d'interactions entre molécules (les forces de liaison par pont hydrogène et les forces de liaisons de Van der Waals) pouvant être assimilées à des forces de frottement internes qui existent dans les contacts solide-solide. Ces forces vont s'opposer à la libre rotation des molécules et de la friction produite, naît le dégagement de chaleur (**Metaxas et Meredith, 1983 ; Roussy et Pearce, 1995**).

Le transfert de chaleur sous chauffage micro-ondes est complètement inversé par rapport au chauffage conventionnel. Alors que le transfert de chaleur classique se transmet de l'extérieur vers l'intérieur du récipient, sous chauffage micro-ondes, le volume traité devient lui-même source de chaleur : on parle de dégagement de la chaleur de l'intérieur vers l'extérieur du récipient. La paroi externe du réacteur est plus froide que le milieu du réacteur dans le cas du chauffage micro-ondes, et inversement pour le cas du chauffage conventionnel par double enveloppe, plaque chauffante et flamme. C'est un mode de chauffage instantané en volume et non en surface. Les phénomènes thermiques de conduction et de convection ne jouent plus qu'un rôle secondaire d'équilibrage de la température. La **Figure 15** illustre ces deux modes de chauffage et présente le mécanisme du chauffage par micro-ondes et l'inversion des phénomènes de transfert de chaleur induit.

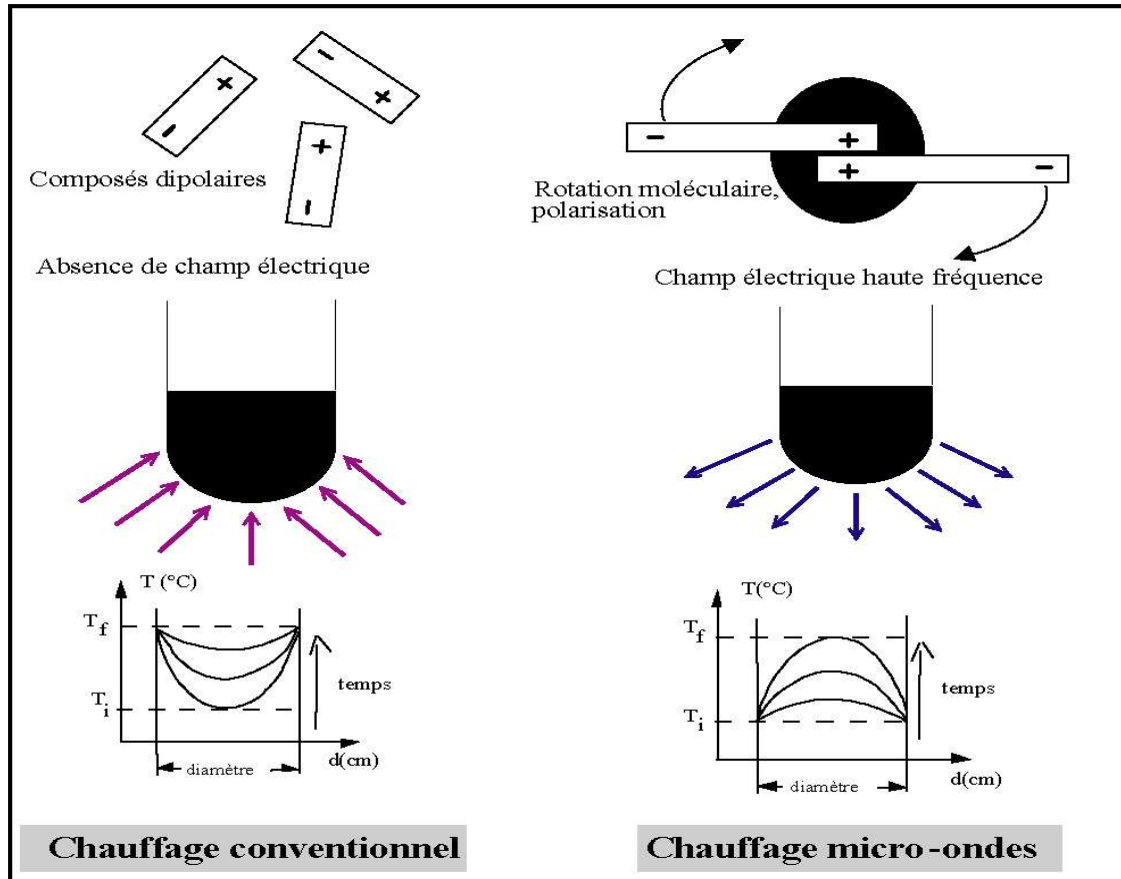


Figure 15 : Transferts thermiques sous chauffage conventionnel et micro-ondes.

I.5.3. Les procédés d'extraction assistés par micro-ondes

I.5.3.1 L'extraction par solvant assistée par micro-ondes (ESMO)

Ganzler *et al.* (1986) en Hongrie, furent les premiers à présenter une technique d'extraction par solvant assistée par micro-ondes en vue d'une analyse chromatographique. Ce procédé consistait à irradier par micro-ondes de la matière, végétale ou non, broyée au préalable en présence d'un solvant absorbant fortement les micro-ondes (le méthanol) pour l'extraction de composés polaires ou bien en présence d'un solvant n'absorbant pas les micro-ondes (hexane) pour l'extraction de composés apolaires. Cette technique se présentait, pour beaucoup, plus efficace qu'une méthode conventionnelle et permettait de réduire les temps d'extraction et donc les dépenses en énergie.

Les travaux sur l'extraction par solvant assistée par micro-ondes ont continué d'avancer, et c'est en 1990 que l'équipe canadienne de Paré (**Paré *et al.*, 1990**) a déposé

le premier brevet européen sur « l'extraction de produits naturels assistée par micro-ondes ». Ils proposaient d'irradier le matériel végétal en présence d'un solvant transparent aux micro-ondes de type hexane et où les micro-ondes atteindraient directement les systèmes glandulaires et vasculaires du végétal.

Des essais effectués par cette nouvelle technique notamment sur la menthe, soulignent à nouveau le gain de temps ainsi qu'une qualité similaire des produits à celle obtenu par entraînement à la vapeur classique. Par la suite, de nombreux brevets seront déposés par Paré et son équipe tant au niveau américain qu'au niveau européen (**Paré et al., 1990 ; Paré et al., 1991 ; Paré, 1994**). Le procédé original sera par la suite quelque peu modifié et enrichi et sera dénommé : MAPTM (Microwave Assisted Process). Il a pour vocation d'être une méthode d'extraction utilisable pour un grand nombre de matrices solides ou liquides telles que les végétaux mais aussi les tissus animaux, les sols, les cosmétiques ou les eaux polluées. Actuellement l'extraction assistée par micro-ondes (MAE : Microwave Assisted Extraction) est plus généralement citée dans les travaux publiés. En réalité, la MAE et MAPTM sont toutes deux des techniques d'extraction par solvant assistée par micro-ondes. Un pilote d'extraction des épices et aromates par la technique MAPTM est présenté dans la **Figure 16**.

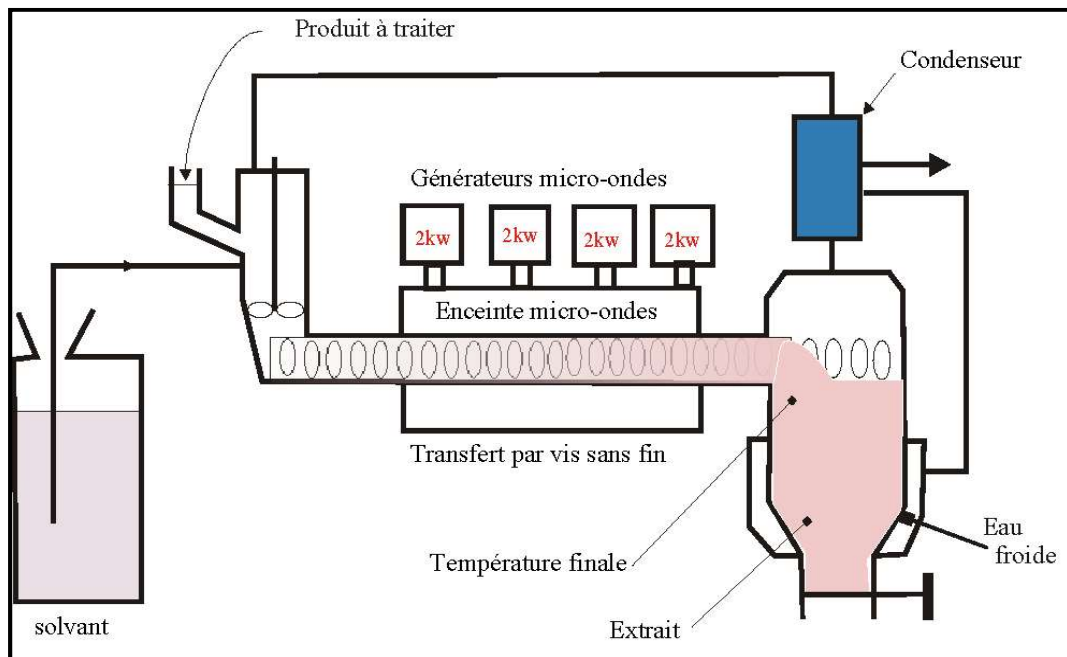


Figure 16 : L'extraction par solvant assistée par micro-ondes (ESMO).

I.5.3.2. L'entraînement à l'air assistée par micro-ondes (EAMO)

Craveiro *et al.* (1989) ont proposé une technique originale d'extraction de l'huile essentielle de *Lippia sidoides* par chauffage micro-ondes sans solvant en utilisant un compresseur à air. L'huile essentielle extraite en 5 minutes sous chauffage micro-ondes était présentée comme qualitativement identique à celle obtenue par entraînement à la vapeur en 90 minutes. Le système proposé est inspiré du procédé d'entraînement à la vapeur d'eau classique. Il se compose en fait de trois parties : un compresseur envoyant de l'air dans le ballon où se trouve la matière végétale placée dans un four micro-ondes domestique, comme le montre la **Figure 17**.

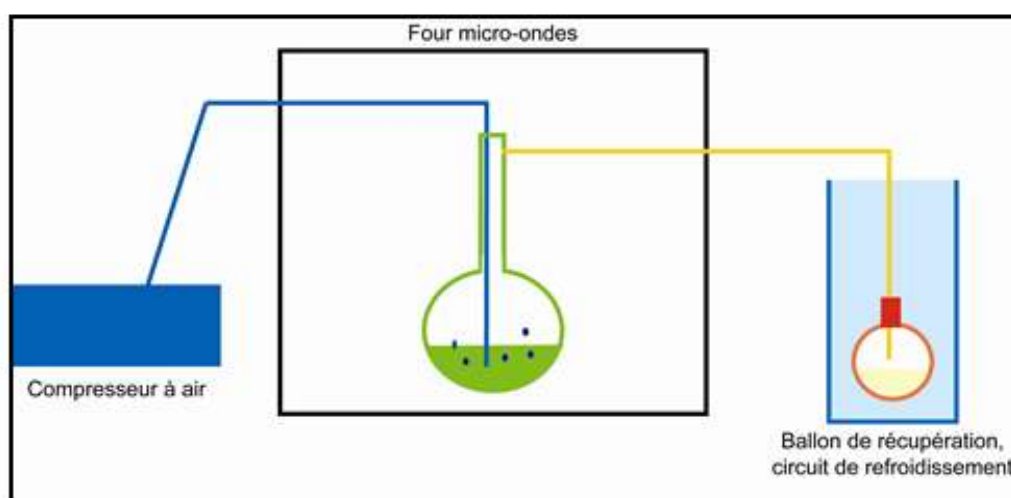


Figure 17 : Entraînement à l'air assisté par micro-ondes (EAMO).

I.5.3.3. L'hydrodistillation par micro-ondes sous pression réduite (VMHD)

Le procédé « VMHD » ou Vacuum Microwave HydroDistillation a été élaboré et breveté par la société Archimex dans les années 1990, avant d'être racheté par l'équipementier Pierre Guérin (Mengal et Monpon, 1994). Cette technique d'extraction, dont l'origine est l'hydrodistillation classique, est basée sur l'utilisation conjointe des micro-ondes et d'un vide pulsé. Le matériel végétal traité, frais ou sec (auquel cas on lui rajoute la quantité d'eau requise) est soumis aux micro-ondes dont le rôle est d'assurer le transfert de matière, puis à un vide pulsé qui permet l'entraînement azeotropique des substances volatiles à une température inférieure à 100°C. Cette

opération peut être répétée plusieurs fois selon le rendement souhaité. D'après les concepteurs du VMHD (**Figure 18**), l'extraction serait dix fois plus rapide que l'hydrodistillation pour un rendement équivalent et un extrait de composition identique. Les notes « crues », les plus thermosensibles, semblent être conservées après une extraction par VMHD contrairement à une hydrodistillation classique (**Mengal et al., 1993 ; Toursel, 1997**).

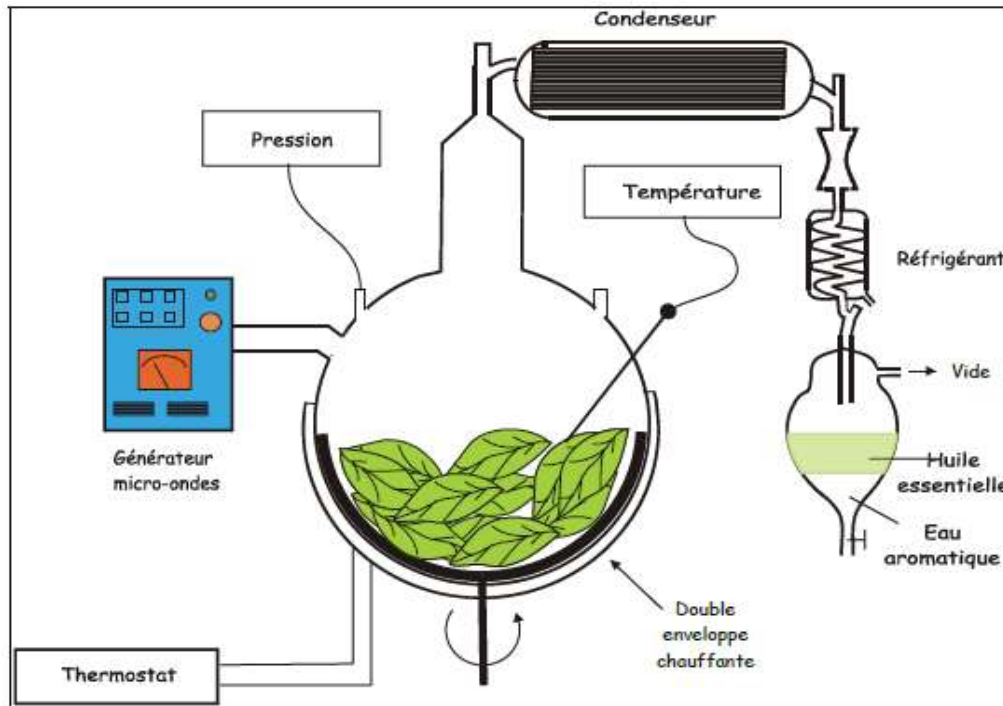


Figure 18 : Hydrodistillation assistée par micro-ondes sous pression réduite (VMHD).

I.5.3.4. L'hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDMO)

Stashenko et al. (2004a,b), utilisent un procédé d'hydrodistillation par micro-ondes. Ce procédé basé entièrement sur le principe de l'hydrodistillation classique consiste à placer une partie du montage d'hydrodistillation dans le four à micro-ondes (**Figure 19**). Le matériel végétal est donc placé en présence d'une quantité d'eau suffisante dans un ballon disposé dans l'enceinte du four à micro-ondes. Le système de réfrigération ainsi que la partie prévue pour la récupération des essences sont situés à

l'extérieur du four. Les avantages cités sont la rapidité et la similitude de la composition de l'huile par rapport à une hydrodistillation classique.

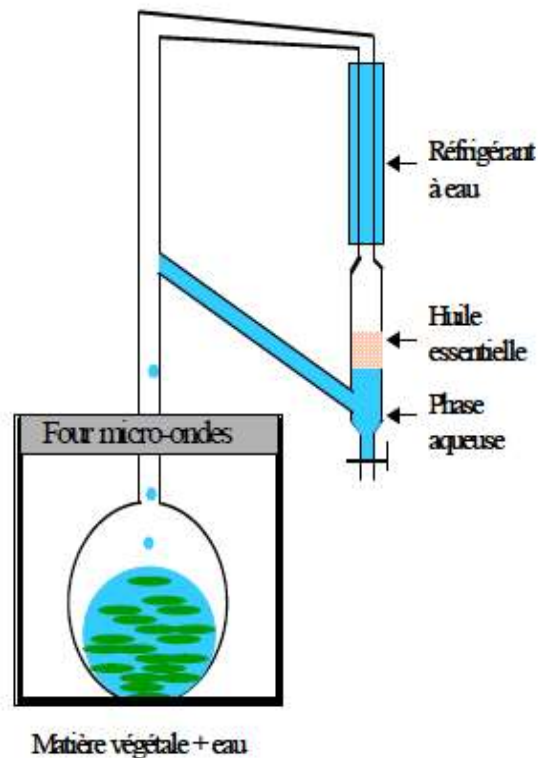


Figure 19 : L'hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDMO).

1.5.3.5. L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (ESSAM)

En 2004, une méthode originale d'extraction des produits naturels assistée par micro-ondes sans solvant et sans eau à pression atmosphérique a été développée et brevetée (Chemat *et al.*, 2004a,b). Basée sur un principe relativement simple, cette méthode décrit une distillation sèche assistée par micro-ondes qui consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur micro-ondes sans ajouter ni eau ni solvant organique. Le chauffage de l'eau interne à la plante permet la rupture des glandes contenant l'huile essentielle. Cette étape libère l'huile essentielle qui est ensuite entraînée par la vapeur d'eau produite à partir de l'eau de la matière végétale. Un système de refroidissement à l'extérieur du four micro-ondes permet la condensation du distillat, composé d'eau et d'huile essentielle, de façon continue et le retour de l'excès d'eau à l'intérieur du ballon

afin de maintenir le taux d'humidité propre au matériel végétal (**Figure 20**). La distillation sèche assistée par micro-ondes, a été appliquée à deux types de plantes, les épices (**Lucchesi *et al.*, 2004b**) et les herbes aromatiques (**Lucchesi *et al.*, 2004a,b**). Pour les plantes aromatiques, les rendements en huiles essentielles obtenus par ESSAM après seulement 30 minutes d'extraction sont identiques à ceux obtenus après 6 heures d'hydrodistillation. D'un point de vue qualitatif, on retrouve dans les huiles essentielles obtenues par ESSAM une proportion plus importante de composés oxygénés, les plus valorisables sur le plan olfactif.

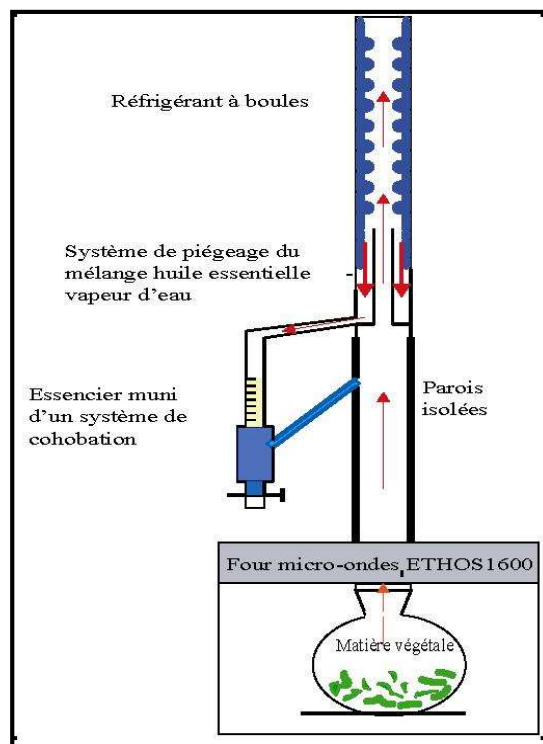


Figure 20 : Extraction sans solvant assistée par micro-ondes (ESSAM).

1.5.4. Application de l'extraction micro-ondes dans les produits naturels

Depuis 1986, de nombreuses matrices, dont la matière végétale, ont été soumises à une extraction assistée par micro-ondes et ont fait l'objet de plusieurs expériences. En effet, le monde végétal nous offre une multitude de plantes à valoriser d'un point de vue alimentaire, certes, mais aussi d'un point de vue thérapeutique,

cosmétique et dans le domaine de la parfumerie. Une grande partie des plantes extraites par les techniques assistées par micro-ondes appartiennent à la famille des Lamiacées. La menthe, le romarin, le basilic ou le thym sont vraisemblablement les plus souvent cités. De grandes familles au caractère aromatique comme les Ombellifères, les Cupressacées ou encore les Magnoliacées ont été étudiées. De la même façon, diverses parties de plantes susceptibles de contenir des glandes à huile essentielle, ont fait l'objet d'une extraction : les rhizomes du gingembre, les feuilles ou feuillages de Lamiacées et le bois de cèdre. La composition des parties aériennes des végétaux reste toutefois la plus étudiée. Le **Tableau 3** recense quelques plantes ayant fait l'objet d'une extraction de leurs huiles essentielles ou des extraits aromatiques par extraction micro-ondes.

Tableau 3 : Recensement de quelques plantes soumises à une extraction par micro-ondes.

Famille - Espèces végétales	Type d'extraction	Résultats de l'extraction	Réf.
Alliacées			
Ail (<i>Allium sativum</i> L.)	ESMO	2-vinyl-1,3-dithi-4-ène : 49,4% (HD : 0%, Hdiff : 1,84%)	Paré, 1994.
Apiaceae			
<i>Eryngium foetidum</i> L	MAHD	Rdt: 0,061 % en 27 min (HD ; 0,053% en 6h)	Thi et al., 2008.
Annonacées			
<i>Xylopia aromatica</i> Lam.	HDMO	Rdt: 1,5% en 30 min (HD: 1,5% en 2h)	Stashenko et al., 2004a.
Composées			
Estragon (<i>Artemisia dracunculus</i> L.)	ESMO		Jean et al., 1992.
Tanaisie (<i>Tanacetum vulgare</i> L.)	ESMO		Collin et al., 1993.
Cupressacées			
Cèdre (<i>Thuja occidentalis</i> L.)	ESMO		Paré et al., 1991.
Citrus			
<i>Citrus (Citrus sinensis</i> L.)	MAD	Rdt : 0.42% en 30 min (HD : 0,39% en 180 min).	Ferhat et al., 2006.
<i>Citrus (Citrus sinensis</i> L.)	MSDf	Rdt: 1.54 % en 12 min (SDF: 1.51% en 40 min).	Farhat et al., 2011.
Lauraceae			
<i>Cinnamomum Camphora</i>	MAHD	Rdt : feuille 1,73 % en 45 min (HD 1,71% en 150 min)	WeiL et al., 2013.
Lamiacées			
Lavande <i>lavandula intermedia</i> var. <i>grosso</i>	MHG	Rdt : 5,4 % en 15 min (HD 5,4% en 60 min)	Perino-Issartier et al., 2013.
Basilic (<i>Occimum americanum</i> L.)	EAMO	Rdt : 2,1% (EV : 2,1%)	DeVaconcelos et al., 2003.
Basilic (<i>Occimum basilicum</i> L.)	ESSAM	Rdt équivalent, ESSAM : 30 min et HD 4h30	Lucchesi et al., 2004a.
Basilic (<i>Occimum gratissimum</i> L.)	EAMO		De Vaconcelos et al., 1999.
Hysope (<i>Hyssopus officinalis</i> L.)	ESMO	Rdt: 0,4% en 50s (Hdiff: 0,5% en 2h)	Jean et al., 1992.
Romarin (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)			
Romarin (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	SFME	Rdt : 0,39 % en 40 min (HD 0,31 % en 3 h)	Okoh et al., 2010.
Rosemary (<i>R. officinalis</i> L.)			
Rosemary (<i>R. officinalis</i> L.)	MHG	Rdt: 0,33% en 15 min (HD: 0,35% en 180 min)	Bousbia et al., 2009.
Marjolaine (<i>Origanum marjorana</i> L.)			
Marjolaine (<i>Origanum marjorana</i> L.)	ESMO	Rdt: 1,17% en 50s (Hdiff: 1,00% en 2h)	Jean et al., 1992.
Menthe poivrée (<i>Mentha piperita</i> L.)			
Menthe poivrée (<i>Mentha piperita</i> L.)	VMHD	Rdt :1,01% en 15 min. (HD: 1,04% en 2h)	Mengal et al., 1993.
	ESMO	Rdt : 0,296% à 0,474% (EV: 0,3% en 2h)	Paré et al., 1991; Spiro, 1995.
Menthe des jardins (<i>Mentha crispa</i> L.)			
Menthe des jardins (<i>Mentha crispa</i> L.)	ESSAM	Rdt équivalent, ESSAM : 30 min et HD 4h30	Lucchesi et al., 2004a.
Monarde (<i>Monarda fistulosa</i> L.)			
Monarde (<i>Monarda fistulosa</i> L.)	ESMO	Rdt : 1,49% (EV : 0,94%)	Paré, 1994.

Origan (<i>Origanum vulgare</i> L.)	ESMO	Rdt : 0,3% en 50s (Hdiff: 0,5% en 2h)	Jean <i>et al.</i> , 1992.
Romarin (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	ESMO		Chen et Spiro, 1995.
Sariette (<i>Satureja hortensis</i> Hort.)	ESMO	Rdt : 0,5% en 50s (Hdiff: 0,4% en 2h)	Jean <i>et al.</i> , 1992.
Sauge (<i>Salvia officinalis</i> L.)	ESMO	Rdt : 1,05% en 50s (Hdiff: 1,5% en 2h)	Jean <i>et al.</i> , 1992.
	VMHD	Rdt : 2,55mL d'HE/100g mat. sèche (2,77mL d'HE/100g mat. sèche)	Mengal <i>et al.</i> , 1993.
Thym (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	ESSAM	Rdt équivalent, ESSAM : 30 min et HD 4h30	Lucchesi <i>et al.</i> , 2004a.
Magnoliacées			
Anis étoilé (<i>Illicium anisatum</i> H.f.)	ESSAM	Rdt : 1,38% en 1h (HD : 4,16% en 8h)	Lucchesi <i>et al.</i> , 2004b.
Myricacées			
Myrte des marais (<i>Myrica gale</i> L.)	ESMO	Nanocosane : 71,2% (HD : 0%)	Bélanger <i>et al.</i> , 1997.
Ombellifères			
Ajowan (<i>Carum ajowan</i> L.)	ESSAM	Rdt : 1,41% en 1h (HD : 3,34% en 8h)	Lucchesi <i>et al.</i> , 2004b.
Aneth (<i>Anethum graveolens</i> L.)	ESMO	Rdt : 0,25% en 50s (Hdiff: 0,75% en 2h)	Jean <i>et al.</i> , 1992.
Carvi (<i>Carum carvi</i> L.)	ESMO	Rdt : 0,22% en 50s (Hdiff: 0,23% en 2h)	Jean <i>et al.</i> , 1992.
Coriandre (<i>Coriandrum sativum</i> L.)	ESMO		Jean <i>et al.</i> , 1992.
Cumin (<i>Cuminum cyminum</i> L.)	ESMO	Rdt : 0,63% en 1h (HD : 4,3% en 8h)	Lucchesi <i>et al.</i> , 2004b
Fenouil (<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.)	ESMO	Rdt : 0,25% en 50s (Hdiff: 0,60% en 2h)	Jean <i>et al.</i> , 1992.
Persil (<i>Petroselinum crispum</i> Mill.)	ESMO	Rdt : 0,25% en 50s (Hdiff: 0,50% en 2h) Rdt : 0,18% en 60s (EV: 0,225% en 2h)	Paré <i>et al.</i> , 1991 ; Jean <i>et al.</i> , 1992.
Verbenacées			
<i>Lippia alba</i> . Mill	HDMO	Rdt: 0,69% en 30 min. (HD: 0,7% en 2h)	Stashenko <i>et al.</i> , 2004b
<i>Lippia sidoides</i> Cham.	EAMO	Extraction totale: 5 min (EV: 90 min.)	Craveiro <i>et al.</i> 1989.
Zingibéracées			
Gingembre (<i>Zingiber officinale</i> Rosc.)	ESMO	Rdt : 1,97% (Soxhlet 2h : 1,00%)	Alfaro <i>et al.</i> , 2003.

1.5.5. Paramètres régissant les extractions assistées par micro-ondes

La synthèse des travaux effectués montre que plusieurs paramètres doivent être pris en considération lors d'extractions assistées par micro-ondes.

Actuellement, la technique d'extraction par micro-ondes la plus utilisée est incontestablement l'extraction par solvant assistée par micro-ondes (« MAE », ou « MAP »). Si sa rapidité de mise en œuvre en fait une technique de choix pour l'extraction et plus particulièrement pour celle de composés aromatiques d'origine végétale, le produit obtenu n'est en aucun cas une huile essentielle. De plus, l'utilisation

de solvant organique, présente certains inconvénients : contamination du produit fini, problème pour son élimination totale et sa valorisation future. Rappelons que l'industrie agro-alimentaire applique des lois très strictes sur l'origine des produits utilisés.

I.5.5.1. Rapidité de l'extraction

Pour la majorité des plantes étudiées (**Tableau 3**), le paramètre le plus valorisable est incontestablement le temps d'extraction. Alors que l'ordre de grandeur temporel des extractions classiques réalisées (hydrodistillation, hydrodiffusion, ou entraînement à la vapeur d'eau) est l'heure, celui des extractions assistées par micro-ondes est en général la minute.

I.5.5.2. Choix du solvant

Les solvants les plus utilisés dans l'extraction par solvants sous micro-ondes sont l'hexane, le toluène, le tétrachlorure de carbone, le dichlorométhane et l'éthanol. Si le solvant est transparent aux micro-ondes, c'est-à-dire s'il possède une permittivité faible, c'est le matériel végétal qui captera directement le rayonnement micro-ondes. En revanche, si le solvant absorbe les micro-ondes, le chauffage sera plutôt un chauffage de type conducteur : les micro-ondes vont permettre le chauffage du solvant et ce dernier par conduction chauffera le matériel végétal. Le choix du solvant va donc déterminer le type de chauffage et par conséquent le mécanisme d'extraction et la composition du produit final.

D'après **Spiro et Chen. (1995)** lors de l'extraction des constituants aromatiques des feuilles de menthe poivrée, l'utilisation de l'hexane (solvant apolaire et transparent aux micro-ondes) donne des résultats exceptionnellement élevés pour les concentrations en 1,8-cinéole et en menthol. L'observation au Microscope Electronique à Balayage (MEB), a révélé la rupture d'un grand nombre de glandes sécrétrices contrairement aux autres extractions où les glandes sont déformées ou endommagées mais où aucune rupture n'est notée.

I.5.5.3. Puissance micro-ondes appliquée

A quelques exceptions près, les puissances appliquées sont relativement élevées (supérieures à 500W) par rapport à la quantité de végétal à traiter (inférieure à 100g). Cependant la quantité de puissance appliquée est étroitement liée au temps d'extraction ainsi qu'à celle de la température de la matrice. Au cours de l'extraction par solvant

assistée par micro-ondes, les puissances appliquées sont jusqu'à 45 fois supérieures à la masse de végétal à traiter, mais les temps d'extraction varient entre 10 secondes et une minute. L'hydrodistillation assistée par micro-ondes sous vide pulsé (VMHD) nécessite des puissances sensiblement plus élevées (1200W) pour des temps d'extraction de 15 minutes.

L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes applique des puissances en rapport direct avec la quantité de matière végétale à traiter d'où la notion plus appropriée de « densité de puissance ». Cette valeur est généralement de 1 à 2 Watts par gramme de matière végétale traitée en fonction de son degré d'humidité.

I.5.6. Composition chimique

D'un point de vue quantitatif, l'extraction assistée par micro-ondes dans son ensemble, apporte des résultats extrêmement intéressants par rapport aux méthodes classiques utilisées comme références. Dans les travaux cités dans le **Tableau 3** ces méthodes de référence sont l'hydrodiffusion, l'entraînement à la vapeur d'eau ou bien l'hydrodistillation. Dans tous les cas, les temps d'extraction des techniques de référence sont supérieurs à 90 minutes. Les rendements en huiles essentielles ou en extraits aromatiques obtenus par les techniques assistées par micro-ondes sont généralement du même ordre de grandeur ou supérieurs à ceux obtenus par des méthodes de références pour des temps d'extraction beaucoup plus faibles (10 s à 15 minutes). D'un point de vue qualitatif, les différences interviennent surtout au niveau des pourcentages de certains composés aromatiques. Lors de l'extraction des feuilles de myrte des marais, le pourcentage de nonacosane dans l'extrait micro-ondes s'élève à 71,2%, alors qu'il est nul dans l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation. Au contraire, le pourcentage de myrcène très faible dans l'extrait micro-ondes (0,4%), passe à 17,4% dans l'huile essentielle (**Bélangier et al., 1997**).

I.5.7. Effet des micro-ondes sur le matériel végétal

Des photographies au Microscope Electronique à Balayage de graines de cardamome soumises aux deux techniques d'extraction ESSAM et HD ont été réalisées. Cette étude a permis d'observer l'état des canaux avant et après l'extraction (**Paré et Bélangier, 1997**). Les changements relevant de l'extraction assistée par micro-ondes après 60 minutes, sont spectaculaires. Ils montrent des parois cellulaires endommagées. Ceci confirme l'explosion signalée par (**Paré et Bélangier, 1997 ; Lucchesi, 2005**),

produite au niveau de la paroi cellulaire consécutive à l'augmentation soudaine de la température. Ceci concorde avec le mécanisme proposé par (**Chen et Spiro, 1995 ; Paré et Bélanger, 1997 ; Lucchesi, 2005 ;**) pour l'extraction assistée par les micro-ondes des extraits de feuilles de romarin en présence d'hexane. Par ailleurs, la micrographie de l'hydrodistillation signale que quelques parois cellulaires sont toujours uniformes et que leurs contenus sont toujours inchangés.

I.6. Activités biologiques des huiles essentielles

Les vertus des HEs sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans bases scientifiques précises. De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche ont porté sur les activités antimicrobiennes et antioxydantes des huiles essentielles des plantes aromatiques (**Djenane et al., 2011a,b ; Camo et al., 2011 ; Sanchez-Escalante et al., 2011**).

L'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique, aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leurs effets synergiques (**Dorman et Deans, 2000**). Certains antimicrobiens naturels comme le thymol, le carvacrol et eugénol respectivement extrait du thym et du clou de girofle ont démontré leur intérêt pour la conservation des aliments (**Nazer et al., 2005 ; Guillier et al., 2007**).

Plusieurs travaux ont mis en évidence les différentes activités biologiques des plantes aromatiques et médicinales, en particulier leurs pouvoirs antifongiques (**Moleyar et Narasimham, 1986 ; Soliman et Badeaa, 2002 ; Jazet Dongmo et al., 2009**), antibactériens (**Burt, 2004 ; Bourkhiss et al., 2007 ; Magina et al., 2009 ; Avlessi et al., 2012 ; Djenane et al., 2012a,b**), antioxydants (**Stefanovits-Bányai et al., 2003 ; Jukie et Milos 2005 ; Bouzouita et al., 2008 ; Djenane et al., 2016 ; Mechergui et al., 2014**) et insecticides (**Erler et al., 2006 ; Tang et al., 2007 ; Cheng et al., 2009**). D'où les huiles essentielles peuvent servir d'agents antimicrobiens ou d'antioxydants, comme agents antimicrobiens, elles empêchent la croissance des moisissures, levures et bactéries, comme agents antioxydants, elles empêchent les aliments de rancissement, brunissement et développement de black spots, par la suppression de la réaction qui se produit lorsque les aliments se combinent avec l'oxygène en présence de lumière, la chaleur et certains métaux afin de minimiser les dommages à certains acides aminés essentiels et la perte de certaines vitamines (**Okoh, 2010**).

I.6.1. Activité anti microbienne des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont gagné beaucoup d'attention et ont donné naissance à diverses investigations sur leur potentiel antimicrobien alternatif en industrie agroalimentaire. Les substances synthétiques ont été employées couramment. Cependant, en raison du souci croissant des consommateurs aux denrées contenant de tels additifs chimiques, la recherche des additifs naturels, particulièrement d'origine végétale, a notamment augmenté ces dernières années. Par conséquent, le développement des produits naturels possédant une activité antibactérienne s'avère nécessaire et utile (Rožman et Jeršek, 2009 ; Djenane *et al.*, 2012c). Les huiles essentielles sont connues pour posséder l'activité antimicrobienne et, certaines sont classées comme des substances sûres et pourraient donc être employées pour empêcher la croissance des microorganismes pathogènes et contaminants (Gachkar *et al.*, 2007; Rasooli *et al.*, 2008 ; Djenane *et al.*, 2013 ; Djenane, 2015). De nombreux auteurs ont rapporté que les extraits d'herbes ont des composés chimiques capables d'avoir une activité antimicrobienne (Dorantes *et al.*, 2000 ; Djenane *et al.*, 2002,2006 ; Kuda *et al.*, 2004 ; Bousbia, 2004 ; Bousbia *et al.*., 2009 ; Djenane *et al.*, 2011a). Les constituants des huiles essentielles sont actifs contre une large gamme de bactéries, levures et champignons. Omidbeygi *et al.* (2007) ont démontré que les HE de thym, de la sarriette et du clou de girofle présentent une activité antifongique « *in vitro* » contre *Aspergillus flavus*. Les HES d'*Eucalyptus saligna* et d'*Eucalyptus camalduiensis* ont montré un effet fongistatique vis-à-vis de *Phaeoramularia angolensis* (Jaset-dongmo *et al.*, 2008). Belleti *et al.* (2004) ; Fisher *et al.* (2007) ont démontré que les HES de *Citrus* sont efficaces contre les bactéries pathogènes, les spores bactériennes, mais également sur certaines bactéries responsables de toxi-infection alimentaire telles que : *Mycobacterium jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli O157:H7*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Thyphimurium, et *Acrobacter butzleri*. Selon les travaux de Prudent *et al.* (1995) ; Sharma-tripathi, (2006) ; Viuda-martos *et al.* (2008), les HES de *Citrus* : d'orange douce, de citron, de mandarine et pamplemousse exercent une activité antifongique contre *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Penicillium chrysogenum* et *P. verrucosum*.

I.6.1.1. Mécanismes d'action antibactérienne

Les mécanismes par lesquels les HEs exercent leur activité antibactérienne sont mal connus ou encore insuffisamment élucidée (**Lakhdar et al., 2012**). Du fait de la complexité de leur composition chimique, il est difficile de donner une idée précise sur le mode d'action des HEs. Il est probable que leur activité antibactérienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (**Dorman et Deans, 2000 ; Carson et al., 2002 ; Bakkali et al., 2008**). De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des huiles essentielles sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique des cellules (**Rafi, 1994 ; Pattnaik, 1995 ; Davidson, 1997**).

Burt. (2004) a signalé que la caractéristique importante des HEs est attribuée à l'hydrophobicité de certains de ces composants qui leur permet de traverser facilement la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire en altérant sa perméabilité et entraînant des pertes anormales d'ions, voire même des macromolécules. **Oussalah et al. (2006)** suggère que, l'action des HEs sur la prolifération microbienne se fait à travers l'altération de la perméabilité membranaire des bactéries en perturbant les systèmes de transport ionique, le transport des électrons et la production d'énergie.

Le mode d'action des HEs dépend aussi du type de microorganisme. En général, les bactéries Gram négatives sont plus résistantes que les bactéries Gram positives grâce à la structure de leur membrane externe. Ainsi, la membrane extérieure des Gram négatifs est plus riche en lipo-polysaccharides (LPS) la rendant plus hydrophile, ce qui empêchent les terpènes hydrophobes d'y adhérer (**Cristiani et al., 2007**).

I.6.1.2. Facteurs déterminants le degré d'activité antimicrobienne des huiles essentielles

Plusieurs facteurs influencent la détermination de l'activité antimicrobienne des HEs ou de leurs composants actifs, tels que la méthode d'évaluation antimicrobienne, le type et la structure moléculaire des composants actifs, la dose ajoutée, le type de microorganisme ciblé et leur éventuelle adaptation aux HEs.

I.6.2. Activité anti oxydante des huiles essentielles

Au cours de ces dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour la recherche d'antioxydants naturels. Les propriétés antioxydantes de nombreuses herbes et épices ont été signalées pour être efficace (**Djenane *et al.*, 2012d**).

Les antioxydants sont des composés chimiques capables de minimiser efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique, sans effet sur les propriétés sensorielle et nutritionnelle du produit alimentaire. Ils permettent le maintien de la qualité et d'augmenter la durée de conservation du produit (**Djenane *et al.*, 2016**). En outre, l'antioxydant alimentaire idéal, doit être soluble dans les graisses, efficace à faible dose, et non toxique, n'entraîne ni coloration, ni d'odeur, ni saveur indésirable, résistant aux processus technologiques, il est stable dans le produit fini (**Poknory *et al.*, 2001**).

Les antioxydants sont en fait des agents de prévention. Ils bloquent l'initiation, en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres. Ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation ou en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puissent réagir avec un nouvel acide gras (**Berset et Cervelier, 1996**).

Un antioxydant c'est toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques (**Boyd *et al.*, 2003**). Ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs (**Vansant, 2004**).

Les antioxydants sont présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydro- ou liposolubles. Cette grande variété physico-chimique autorise la présence d'antioxydants dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires (**Cano *et al.*, 2006**).

Un radical libre est une espèce chimique, molécule, morceau de molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante (« libre») en contenant un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié sur une orbitale). Cela lui confère une grande réactivité donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura

toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron pour devenir plus stable : il va donc se réduire en oxydant un autre composé (**Goudable et Favier, 1997**). Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (**Favier, 2006**).

I.6.2.1. Antioxydants de synthèse et antioxydants naturels

Il existe de nombreux antioxydants synthétiques dont les squelettes sont souvent dérivés des antioxydants naturels (**Lee et al., 2009**). Ils sont dotés de propriétés antioxydantes anti radicalaires ou préventives pour leur utilisation dans les produits alimentaires.

Pour une utilisation pratique, les antioxydants doivent remplir les conditions suivantes : Ils ne doivent pas être toxiques, ils doivent être hautement actifs à des faibles concentrations (0,01-0,02%) et doivent être présents à la surface ou dans la phase grasse de l'aliment (**Bauer et al., 2010**).

A noter que les antioxydants de synthèse sont efficaces, mais leurs doses autorisées sont largement limitées pour éviter tout problème de toxicité. Les additifs anti oxygènes les plus utilisés à travers le monde sont les :

- Produits de synthèse le butylhydroxyanisole (**BHA**), le butylhydroxytoluène (**BHT**), les gallates et le tert-butylhydroquinone (**TBHQ**). Le plus grand avantage de ces derniers est lié à leur coût bas d'une part, leurs propriétés chimiques et technologiques bien étudiées, qui satisfont dans la plupart des cas la demande des producteurs (**Petkov et al., 1984**). **Figure 21**.

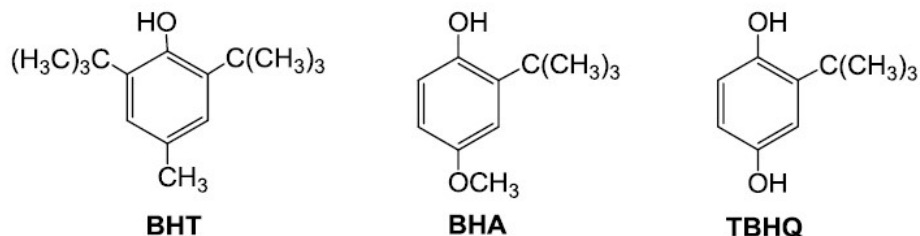


Figure 21 : Structures de BHT, BHA, TBHQ.

- Produits d'origine naturelle ou existant normalement dans certains aliments, mais souvent produits par synthèse : les tocophérols, l'acide ascorbique et son dérivé le palmitate d'ascorbyle, et l'acide citrique (**Figure 22**).

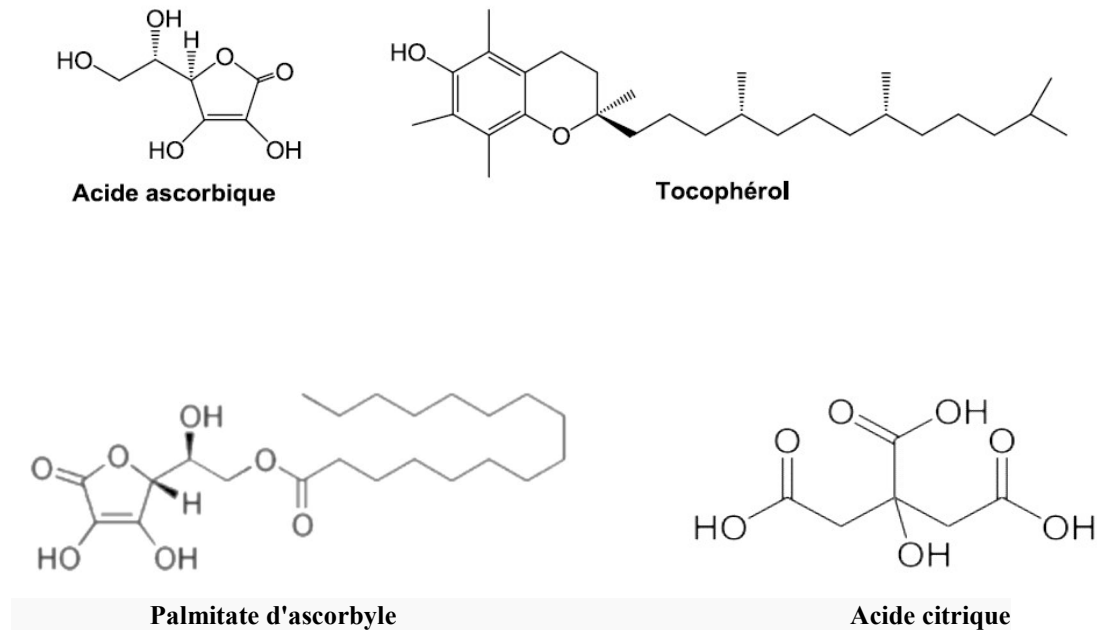


Figure 22 : structures d'acide ascorbique, tocophérol, palmitate d'ascorbyle et l'acide citrique.

1.6.2.2. Méthode d'évaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits naturels est évaluée par de nombreuses méthodes physicochimiques, (**Decker *et al.*, 2005 ; Chemat *et al.*, 2007**). Cependant il n'existe pas de test universel. Tenant en compte la nature diversifiée des antioxydants, ainsi que la complexité des processus d'oxydation, les valeurs de l'activité antioxydante d'un composé diffèrent d'un test à l'autre. Ce qui rend difficile une comparaison entre les méthodes et par la suite une certaine standardisation. Il faut combiner les réponses des tests susceptibles d'être réalisés afin d'avoir une indication aussi précise que possible sur la capacité antioxydante d'un échantillon. L'activité antioxydante peut être évaluée soit par des méthodes directes en dosant des produits formés (les

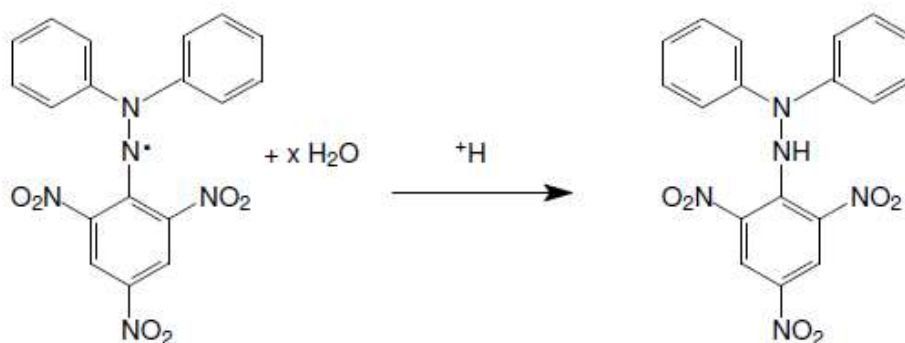
hydroperoxydes par exemple), soit par des méthodes indirectes où l'efficacité d'un antioxydant est révélée en mesurant sa capacité à piéger des radicaux libres grâce à l'utilisation de sonde intermédiaire (**Shahidi et Zhong, 2005**).

L'examen des données bibliographiques fait apparaître de nombreuses méthodes spectrométriques de détermination de l'activité antioxydante. Parmi les tests les plus utilisés, nous présenterons ceux couramment cités et qui ont été utilisés au cours de notre étude : la méthode au **DPPH•** (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl), et la méthode de **SR-TBA**.

I.6.2.2.1. Evaluation de l'activité antioxydante en utilisant la méthode DPPH

Ce test permet de mettre en évidence d'une façon simple la capacité anti radicalaire d'un antioxydant.

Le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (capteur de proton) est un radical libre, stable au cours du temps et largement utilisé pour évaluer l'activité antioxydante d'un composé quelconque (**Cotelle et al., 1996 ; Trouillas et al., 2003**). Le radical DPPH en solution est coloré en violet. En présence d'antioxydant (donneurs de proton) ; le radical DPPH est réduit en formant une liaison moléculaire stable (**Figure 23**). Le produit réduit présente une coloration qui tire vers le jaune. On mesure à l'aide d'un spectromètre UV à 517 nm, la diminution de coloration de la solution qui est proportionnelle à la quantité d'antioxydant. L'activité antioxydante de l'extrait est comparée à celle d'un antioxydant de référence en termes d'équivalence ou en termes d'inhibition.



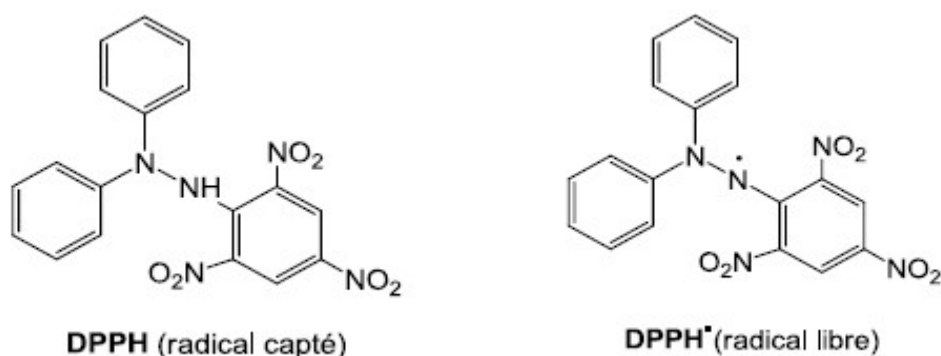


Figure 23 : Principe du test DPPH.

I.6.2.2.2. Evaluation de l'activité antioxydante par la méthode SR-TBA (substance réactive avec l'acide thiobarbiturique)

Cette méthode est couramment utilisée pour doser les produits secondaires de l'oxydation des lipides tels que les aldéhydes et par conséquent évaluer l'activité antioxydante d'un composé (Wang *et al.*, 2002 ; Djenane *et al.*, 2016). L'acide β -thiobarbiturique (TBA) réagit avec le dialdéhyde malonique (MDA) **Figure 24**, pour former un complexe de couleur rose détecté par spectroscopie UV-visible à 532 nm (Ohkawa *et al.*, 1979 ; Djenane *et al.*, 2001,2002,2003). La diminution de l'absorbance traduisant l'inhibition de l'oxydation peut être observée sous l'action des antioxydants.

L'activité antioxydante est déterminée par le pourcentage d'inhibition de la formation du MDA. La décomposition des produits primaires de l'oxydation lipidique produit des mélanges complexes comprenant des époxydes, des cétones, des hydrocarbures et des aldéhydes saturés et insaturés tels que l'héxanal. C'est ainsi que plusieurs mesures de ces produits finaux ont été utilisés dans le but d'évaluer la capacité antioxydante. Par exemple l'indice d'anisidine a été couramment employé pour mesurer la formation de 2-alcène au cours de l'oxydation des lipides. Les composés comportant dans leurs structures des groupements carbonyles en incluant le pentanal, et l'octa 3,5-dien-2-one semblent être les principaux responsables du mauvais goût associé à la rancidité dans plusieurs produits alimentaires (Corbo *et al.*, 2000).

L'hexanal est le produit final le plus abondant, et par conséquent le plus employé comme marqueur de la propagation du processus d'oxydation lipidique.

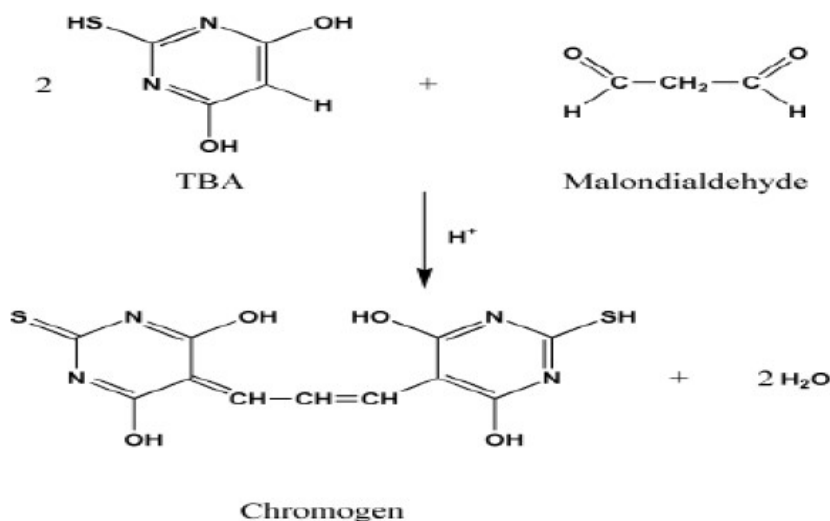


Figure 24 : Formation du complexe chromogène par réaction de TBA et MDA (Antolovich, 2002).

I.6.3. Toxicité des huiles essentielles

Bien que d'origine naturelle et leurs effets bénéfiques, les HEs les peuvent se révéler dangereuses pour la santé et même toxique. La majorité des huiles essentielles, à de très fortes doses, causent des effets toxiques (Hammer et Carson, 2011). Par leur composition chimique riche, les huiles essentielles doivent être utilisées avec une extrême prudence, du fait qu'elles peuvent présenter de très graves dangers lors d'une utilisation aléatoire autonome, surtout que le consommateur est attiré par la facilité d'emploi de ces essences en absorption interne ou en application externe (Bernadet, 1983). Les huiles essentielles de *Citrus* sont photo-toxiques à cause des furocoumarines qui sont photosensibilisantes. Ils provoquent une décoloration de la peau en un rouge lors d'une application externe avec une exposition au soleil sous l'action des rayons ultraviolets. Cependant, l'ingestion des huiles essentielles du *Citrus limon* extraites soit

par hydrodistillation soit par expression à froid ne présente aucun risque de toxicité, ni aiguë ni chronique (**Robert et Lobstein, 2005**).

I.6.4. Application des huiles essentielles dans les industries alimentaires

Les HEs disposent de nombreux atouts. Elles sont utilisées, pendant de nombreux siècles dans la plupart des civilisations, à des fins religieuses, cosmétiques et médicales. Les HE des plantes sont largement utilisées dans la conservation des aliments (**Djenane et al., 2006**). Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues (**Amarti, 2010 ; Schelz et al., 2010**).

Dans ces dernières années, une attention croissante est tirée vers l'exploration des ressources naturelles à cause de la demande élevée des aliments sans additifs chimiques synthétiques, les HEs par leurs propriétés antimicrobiennes et antioxydantes sont considérées le leader pour répondre à cette tendance (**Wang et al., 2010a,b**).

Les HEs peuvent servir d'additifs alimentaires ou d'agents de conservation qui soutiennent la production, la transformation et maintiennent les propriétés organoleptiques désirées. Elles peuvent assurer plusieurs fonctions dans l'industrie alimentaire tel que l'amélioration de la valeur nutritive des aliments ; le maintien de la salubrité des aliments et l'appétibilité ; le contrôle d'acidité/alcalinité ; l'amélioration de la saveur et la couleur (**Fouk et al., 2002 ; Sacchetti et al., 2011**). Ces agents naturels viennent réduire ou remplacer les agents de conservation chimiques ou synthétiques qui présentent des effets néfastes sur la santé (**Viuda-Martos, 2009 ; Miguel, 2010**).

En effet, l'utilisation des antioxydants synthétiques tels que l'hydroxytoluène butilé (BHT), ainsi que l'hydroxyanisole butilé (BHA) est suspectée à long terme d'effets mutagènes et cancérigènes (**Mimica-dukic, 2003 ; Burt, 2004 ; Olmedo et al., 2012**).

I.7. Les œufs

I.7.1. Définition des œufs

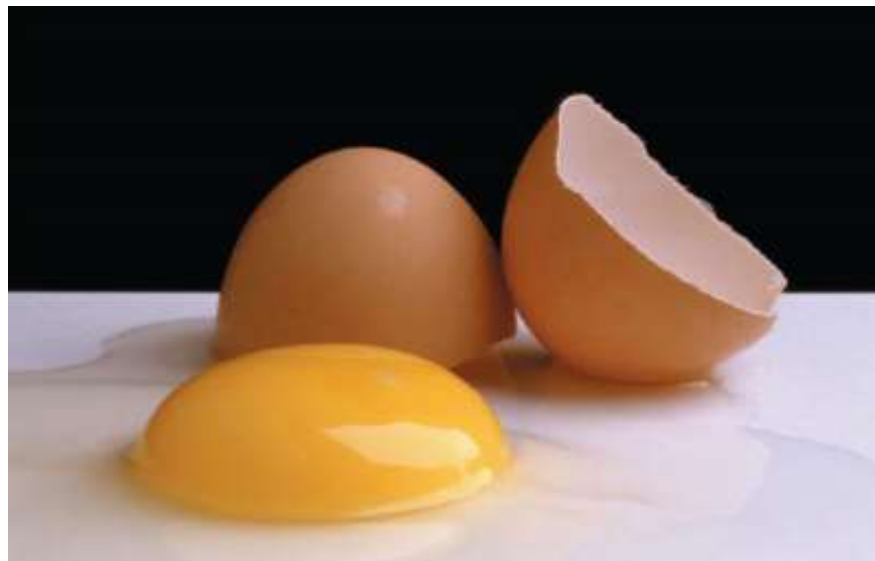
La dénomination « œufs » sans indication d'espèce animale est réservée aux œufs de poule ou espèce *Gallus domesticus*. Lorsqu'il s'agit de l'œuf d'une autre espèce d'oiseau, il est nécessaire de préciser l'espèce (œuf de cane, œuf de l'oie, etc.). Le terme œuf concerne par ailleurs les œufs propres à la consommation humaine, donc

commercialisables et garantissant la totale innocuité quel que soit le mode de cuisson (Sauveur, 1988).

I.7.2. Structure de l'œuf

Dans l'ordre de leur dépôt, les principales parties de l'œuf sont :

- le jaune ou vitellus ;
- le blanc ou albumen ;
- les membranes coquillières qui délimitent la chambre à air ;
- et la coquille recouverte d'une cuticule (**Figure 25**).



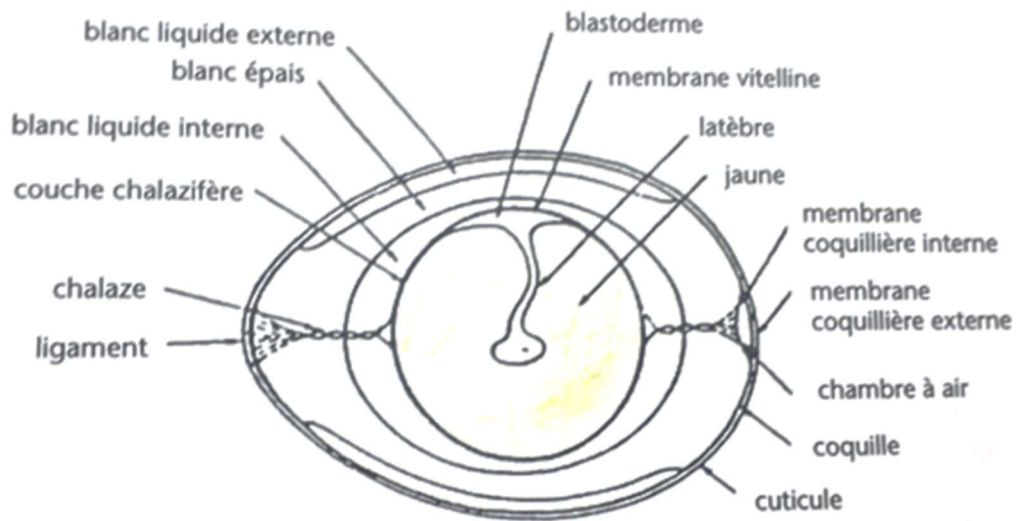


Figure 25 : structure interne de l'œuf (Sauveur, 1988).

L'œuf élaboré par la poule est destiné à assurer la survie et le développement d'un embryon dans l'enceinte close que constitue la coquille. Les barrières naturelles de l'œuf (**Figure 25**) sont la coquille, avec ses membranes externe et interne et le blanc qui contient le lysozyme, de l'avidine et de l'ovalbumine. Le lysozyme inhibe la croissance des bactéries Gram⁺. L'avidine bloque la biotine qui est un facteur de croissance nécessaire pour de nombreux micro-organismes. La conalbumine complexe le fer et en prive ainsi les micro-organismes. Le pH élevé de l'œuf entre 9,3 et 9,6 est aussi peu favorable à la croissance des micro-organismes (Nys et Sauveur, 2004). Les micro-organismes qui pourraient contaminer les œufs doivent être capables de traverser ces barrières et ensuite de poursuivre leur croissance à l'intérieur. La pénétration des micro-organismes dans la coquille est plus facile quand la coquille est humide, car les pores de cette dernière permettent les échanges gazeux. Après la ponte, la température de l'œuf passe de 40 °C à la température ambiante 25 °C, la différence de température crée une force de succion qui permet l'entrée des micro-organismes à l'intérieur. Si l'œuf n'est pas proprement nettoyé et entreposé, la pénétration peut être rapide et la détérioration est alors possible (Gast *et al.*, 2005a).

I.7.3. Stockage des œufs coquilles

D'après **De Pury (1968)**, il est important de refroidir les œufs justes après la pente, si possible à 10 °C pendant 24 heures. Les œufs devraient être entreposés dans des conditions qui limiteront le risque de maladie humaine en réduisant la possibilité de contamination microbienne, chimique ou physique et en minimisant la propagation excessive de pathogènes microbiens, les conditions d'entreposage devraient réduire au minimum l'humidité sur la surface de la coquille (**Commission codex alimentarius CX/FH, 2002**).

Les œufs sont stockés dans des locaux climatisés (en général à 15 °C) ou en chambre froide à 4 °C, selon la durée du stockage. Des bonnes conditions de stockage (notamment températures basses et constantes, hygrométrie contrôlée, locaux hygiéniques) sont essentielles pour limiter l'apport de microorganismes, la pénétration, la migration et la multiplication des microorganismes dans l'œuf (**Baron et Jan, 2010**).

D'après **Copin et al. (1994)** si la durée de stockage des œufs avant cassage est inférieure à 7 jours, il convient de maintenir une température inférieure à 13 °C ; au delà de cette durée, une température proche de 7 °C est fortement préconisée.

I.7.4. Production des œufs

Selon les estimations de la **FAO** (organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture), la production d'œufs de poules dans le monde a atteint **68,3 millions de tonnes en 2013 (ITAVI, 2015)**. La Chine est le premier producteur mondial, suivie de l'Union européenne, des États-Unis, de l'Inde et du Japon. Au sein de l'Europe, c'est la France qui est le majeur contributeur avec **14,8 milliards d'œufs en 2013/2014**.

Sur le plan international, la consommation moyenne d'œufs était estimée par la **FAO** à environ **145 œufs** par habitant et par an en **2009**, soit autour de **8,9 kilos** per capita chaque année. En France la moyenne est de **216 œufs** par an entre **2012** et **2014 (Nau et al., 2016)**.

La production algérienne d'œufs s'est accrue par la forte demande en œufs de consommation suite au renchérissement du prix des viandes. Les investissements consentis dans ce cadre ont permis d'obtenir des niveaux de consommation de **120 œufs**

par habitant et par an (**Felliachi, 2003**). EN 2016 Les Algériens figurent parmi les plus grands consommateurs d'œufs, avec une moyenne de **300** œufs par habitant et par an, soit le double de la moyenne mondiale (**communication orale MADR, 2016**).

Selon les statistiques productions **FAO 2014**, l'Algérie a produits 351512 tonne d'œufs en coquille en **2014 (FAOSTAT, 2014)**.

I.7.5. Valeur nutritionnelle de l'œuf

L'œuf est connu depuis toujours comme un aliment d'une valeur nutritionnelle exceptionnelle pour l'homme, de par sa richesse en protéines d'excellente qualité biologique, deux œufs équivalent à 100g de viande. Cette caractéristique fait de l'œuf un aliment plastique, indispensable au renouvellement cellulaire plus qu'un aliment énergétique (**Gast et al., 2005b**).

L'œuf peut être défini comme une source peu énergétique de protéines parfaitement équilibrées et de lipides de très bonne digestibilité, assurant par ailleurs 20 à 30 % du besoin journalier de l'homme en de nombreux minéraux et vitamines (pour 100g d'œuf) **Tableau 4 et 5** .Il est cependant déficient en glucides, Calcium et vitamine C. Ces qualités font de l'œuf un aliment particulièrement indiqué pour les populations sensibles à l'équilibre de leur ration enfants, personnes âgées ou convalescentes. L'œuf est enfin le seul aliment d'origine animale capable d'être conservé à l'état cru pendant une période notable à température ambiante (**Nys et Suveur, 2004**).

L'œuf présente l'avantage d'être un aliment peu onéreux, sûr, qui ne souffre d'aucun interdit culturel ou religieux. Cependant son image nutritionnelle est sujette à croyance et polémique auprès du grand public. Source de protéines, lipides de qualité, d'acides gras essentiels, de vitamines et minéraux biodisponibles, la perception du risque cardiovasculaire lui reste néanmoins et injustement associée, l'œuf est un aliment de choix (**Nau et al., 2016**).

La composition globale de l'œuf a été plusieurs fois décrite par plusieurs auteurs (**Bourgeois et al., 1994 ; Nys et Sauveur, 2004 ; Seuss-Baum, 2007**). En moyenne, l'œuf est composé de 60% de blanc (solution saline comprenant 11% de protéines), 30% de jaune (50% d'eau, 16% de protéines et 34% de lipides) et 10% de coquille (**Nau et al., 2010**). L'œuf entier (sans coquille) contient en moyenne 75% d'eau, 12,5% de protéines et de 10 à 11% de lipides. Les constituants comestibles majeurs de l'œuf sont

rapportés (**Tableau 4 et 5**), pour 100 g de produit consommable. Ils sont considérés comme relativement stables et sont modulés principalement par la proportion de blanc et de jaune dans l'œuf, proportion elle-même dépendante de l'origine génétique mais surtout de l'âge de la poule et, pour un âge donné, du poids de l'œuf. Cette variabilité physiologique de la proportion blanc/ jaune explique probablement une part des écarts observés entre données publiées par les pays européens ; mais il est probable que la diversité des méthodes analytiques employées pour quantifier les différents nutriments explique une autre part de ces écarts. Un échantillon «d'œuf standard» devrait être défini sur la base d'une proportion moyenne de blanc et de jaune, ce qui n'est malheureusement jamais indiqué dans les tables de composition actuellement disponibles. La comparaison des tableaux établis dans les différents pays fait aussi ressortir une variabilité plus importante des constituants mineurs, ce qui est en accord avec l'observation classique selon laquelle il est possible de faire varier de manière importante leur teneur dans l'œuf par modification de l'alimentation de la poule pondeuse (**Bouvarel *et al.*, 2010**).

Tableau 4 : Composition moyenne de l'oeuf (par 100 g ; oeuf sans coquille), d'après **Suveur, 1988; Gittins et Overfield, 1991 ; Blum et Suveur, 1996 ; Yamamoto et al.,1997** Cité par **(Nys et Suveur, 2004)**.

Nutriments	Blanc	Jaune	Œuf ⁽¹⁾	CV ⁽²⁾ (%)	ANC ⁽³⁾	100 g œuf % ANC
Proportion part comestible ⁽⁴⁾	60	30,7	90,7			
Eau (g)	88,6	49	74,4	1,2		
Calories (Kcal)	47	364	154		2700	6
Protéines (g)	10 ,6	16,1	12,3	4,7	42	29
Glucides (g)	0,8	0,5	0,7			
Cendres (g)	0,5	1,6	0,9	4,6		
Lipides (g)	0,1	34,5	11,9	6,9		
Triglycérides (g)		22,9	7,7			
Phospholipides (g)		10	3,4			
Acides gras saturés (g)		13	4,4			
16 :0 acide palmitique		7,3	2,5	21,4	19 ,5	22,5
18 :0 acide stéarique		2,5	0,86	23		
Acides gras insaturés (g)		20,7	7		49,5	14
16 :1-acide palmitoléique		1,1	0,4	30,4		
18 :1- acide oléique		12	4,1	18		
18 :2- acide linoléique (n-6)		3 ,6	1,25	40	10	12,5
18 :3-acide linoléique (n-3)		0,12	0,04		2	2
20 :4-acide arachidonique (n-6, AA)		0,6	0,2			
20 :5-acide eicosapentaénoïque (n-3)		0	0			
22 :6-acide docosahéxaénoïque (n-3)		0,4	0,15		0,12	125
Cholestérol (g)	0	1,2	0,42	9,5		
Lécithine (Phosphatidylcholine) (g)		7,2	2,3			
Céphaline (g) (phosphatityléthanolamine)		1,4	0,46			
Acide aminés indispensables, mg					mg/j	
Histidine						
Isoleucine	240	410	290		840	34
Leucine	560	870	660		1400	47
Lysine	880	1390	1040		2400	44
Méthionine+cystine	660	1170	820		2450	33
Phénylalanine+tyrosine	670	660	640		1400	45
Thréonine	1020	1420	1150		2240	51
Tryptophane	470	850	590		1120	52
Valine	170	240	190		280	68

(1) Œuf sans coquille.

(2) Coefficient de variation, Gittins et Overfield 1991.

(3) ANC, recommandations journalières pour l'homme adulte, mâle de 70 kg (Martin et al., 2001).

(4) Par rapport à l'œuf entier (avec coquille).

Tableau 5 : composition moyenne de l'œuf (100g de produit frais) en vitamines et minéraux et couverture de besoin de l'homme adulte (Nys et Suveur, 2004).

Nutriments	Blanc/100g	Jaune/100g	Œuf entier /100g frais	CV ⁽¹⁾ (%)	ANC ⁽²⁾	100g œuf % ANC
Minéraux (mg/100g)	500	1600	700			
Sodium	155	50	120	8-11	7000	2
Chlore	175	162	172		5000	3
Potassium	140	100	125	8-11	600	21
Calcium	8	133	50	8-11	900	5,5
Phosphore	18	530	193	8-11	750	26
Fer	0,1	4,8	1,7	12	9	19
Magnésium	10	15	12		350	3
Soufre	163	165	164			18
Zinc	0,12	3,9	1,3	28	9-14	11
Cuivre	0,02	0,14	0,06	40	2	3
Manganèse	0,007	0,11	0,04	28	1-2,5	2
Iode	0,003	0,14	0,05		0,15	33
Vitamines (µg/100g)						
Acide Ascorbique	0	0	0		110000	0
A, Rétinol Equivalent	0	450	150	37	800	19
D	0	4,5	1,5	95	5	30
E	0	3600	1300	46	12000	11
Thiamine B1	10	250	91	17	1300	7
Riboflavine B2	430	480	447	21	1600	28
Niacine B3	90	60	79		14000	0,6
Biotine B8	7	60	25		50	50
Vitamine B6	10	370	138		1800	8
Vitamine B12	0,1	2,8	1	45	2,4	41
Acide folique B9	12	140	60	35	330	18
Acide pantothénique B5	250	4500	1700	32	5000	34

(1) Coefficient de variation, Gittins et Overfield 1991.

(2) ANC, recommandations journalières pour l'homme adulte, mâle de 70 kg (Martin et al., 2001).

I.7.6. Les ovoproduits

I.7.6.1. Définition des ovoproduits

De tout temps, dans l'alimentation humaine, l'œuf a occupé et occupe encore une place importante tant sur le plan nutritionnel qu'économique. Grâce aux nouvelles technologies, une filière industrielle est apparue, celle des **ovoproduits**.

Ce terme désigne les produits obtenus à partir de tout ou partie de l'œuf après élimination des coquilles et des membranes (**Figure 26**). L'essentiel des ovoproduits résulte de procédés industriels faisant intervenir a minima une étape de cassage, avec éventuellement séparation du blanc et du jaune, une filtration et une pasteurisation avant conditionnement ; ils peuvent également être formulés (rajout de : sels, sucre, texturants,...), restauration hors domicile, pour lesquels ils permettent une facilité d'emploi et de stockage et une garantie sanitaire. Mais il existe également toute une gamme d'ovoproduits cuisinés (œufs durs, omelettes, œufs pochés. . .) à destination du consommateur, soit directement, soit via la restauration collective (**Nau et al., 2016**).

Quand on parle des ovoproduits des œufs, la coquille et les membranes sont alors enlevées. Durant les étapes de préparation (**Figure 26**), les œufs liquides sont sujets aux contaminations provenant des micro-organismes présents sur la coquille, sur les équipements, sur les mains et les vêtements des manipulateurs, dans les ingrédients ajoutés et dans l'emballage final.

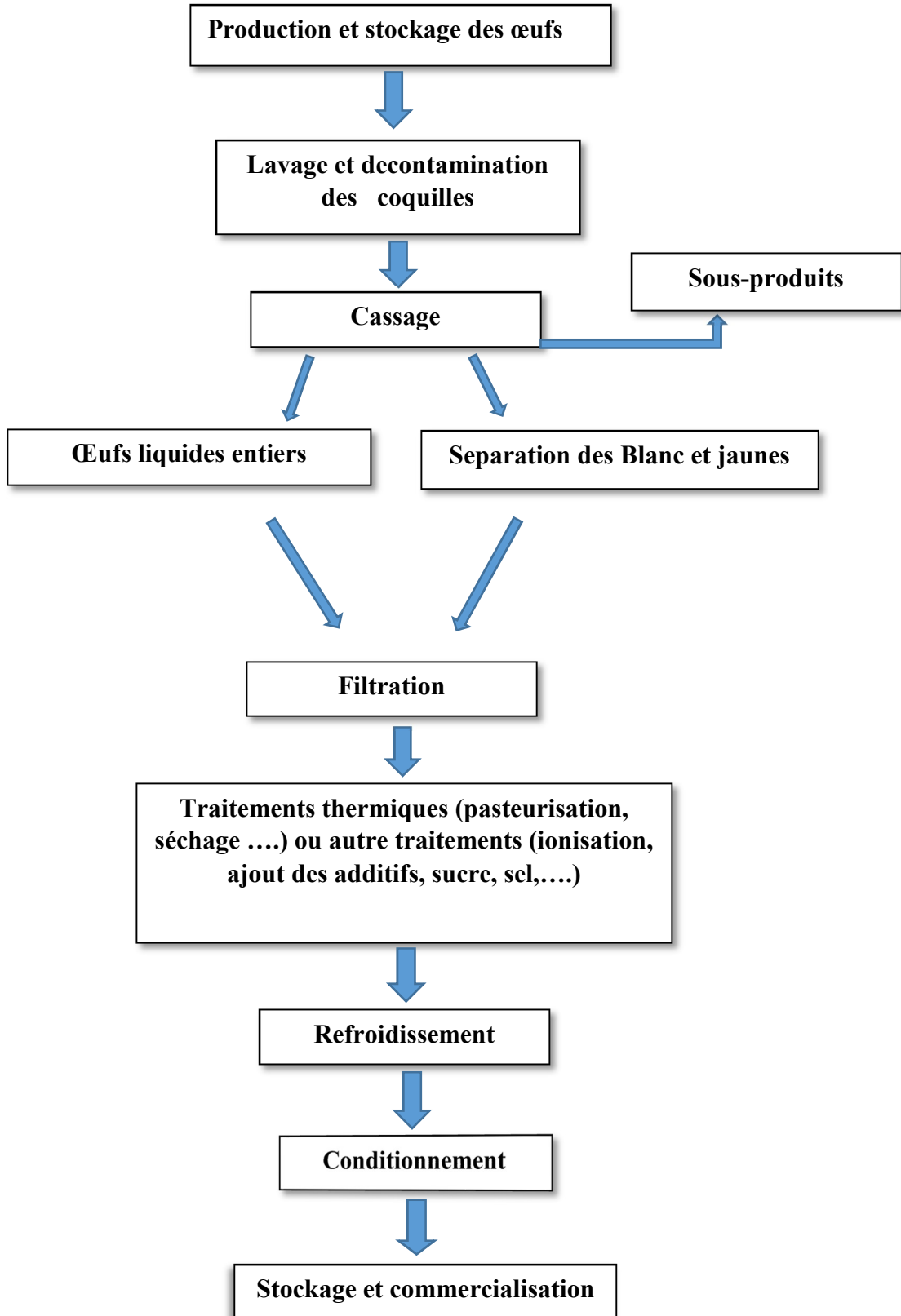


Figure 26: Diagramme de fabrication des ovoproduits selon (Copin *et al.*, 1994 ; Galet *et al.*, 2010).

Les œufs sont aussi transformés pour prolonger leur conservation et faciliter leur utilisation dans les industries alimentaires. C'est ainsi que l'utilisation des œufs liquides pasteurisés, frais ou congelés et déshydratés facilite la manutention entraîne des économies de temps et d'argent.

L'ovoproduit est une denrée alimentaire composée par l'œuf en partie ou en totalité, (glucides, lysosyme) ou additionné d'ingrédients tels que sucre, sel, conservateurs, anticoagulant, et enfin commercialisé sous forme de denrée réfrigérée, congelée ou déshydratée, ayant subi une pasteurisation. Les ovoproduits font passer l'œuf de l'état coquille à l'état transformé, selon des normes très strictes d'hygiène et de sécurité.

I.7.6.2. Les ovoproduits liquides

On peut distinguer 5 types de produits issus de l'opération de cassage (**Figure 26**): les **3 ovoproduits** à proprement parler, c'est-à-dire le blanc d'œuf liquide, le jaune d'œuf liquide et l'œuf entier liquide, et deux sous-produits que sont les coquilles et les ovoproduits non utilisables pour la consommation humaine. Les ovoproduits subissent différentes opérations de séparation, de transformation et/ou de stabilisation, en fonction de leur destination : pasteurisation, sucrage, salage, congélation, concentration, séchage. Ces opérations ont un effet stabilisant, soit par destruction, soit par inhibition du développement des microorganismes présents.

Dans l'industrie des ovoproduits, la destruction des microorganismes est essentiellement réalisée par traitement thermique. Les traitements généralement appliqués en France sont de l'ordre de 65 à 68 °C pendant 5 à 6 min pour l'entier et le jaune. Pour le blanc liquide, le traitement est beaucoup plus faible, de l'ordre de 55 à 57 °C pendant 2 à 5 min, en raison de la très grande thermosensibilité des protéines. Ces barèmes permettent des niveaux de destruction satisfaisants pour les flores végétatives, mais sont inefficaces sur les flores thermorésistantes et notamment les formes sporulées (**Baron et Jan, 2010**).

I.7.6.2.1. L'œuf entier liquide (OEL)

On appelle **OEL** le mélange de blanc d'œuf et de jaune d'œuf. Si les proportions naturellement présentes dans l'œuf coquille sont respectées, on obtient une teneur en

matière sèche variant de 23 à 25%. Cependant, par le biais de l'enrichissement en blanc ou en jaune, on peut obtenir toute une gamme de teneurs en matières sèche adaptées aux différentes utilisations possibles de ces ovoproduits.

Le pH de l'œuf entier à 24% de matière sèche peut varier de 7,0 à 7,6 selon l'âge de l'œuf et les conditions dans lesquelles il a été stocké avant cassage (température notamment). Comme pour le blanc d'œuf, le pH est en effet fonction de la qualité de dioxyde de carbone CO₂ au moment du cassage.

La Date limite de consommation (DLC) à +4 °C, fixée à 5 jours pour l'œuf entier liquide nature pasteurisé (24% de matière sèche), peut aller jusqu'à 12 jours pour l'entier salé à 4% et 1 an pour l'entier sucré à 50% (Copin *et al.*, 1994).

I.7.6.2.2. Le blanc d'œuf liquide (BOL)

Après cassage et séparations du jaune on obtient le blanc liquide, la teneur en matière sèche du BOL est habituellement très proche de 12%. Le seul moyen de modifier ce taux est de « sélectionner » la matière première, à savoir les œufs coquille, et même dans ce cas la variation obtenue ne pourra jamais être supérieure à 1%. Les œufs ayant perdu beaucoup de leur contenu en eau (c.à.d. les œufs présentant une « chambre à air » importante) et les petits œufs de début de ponte sont ceux qui offrent les teneurs en matière sèche les plus élevées dans le blanc. En revanche, des œufs frais de poules plus âgés donneront des teneurs en matières sèche plus faibles. De même, des périodes de grande chaleur peuvent être à l'origine d'une baisse de la teneur en matière sèche du blanc d'œuf.

Le pH du blanc d'œuf peut varier de 7,6 à 9,3, mais est plus communément situé entre 8,4 et 9,2, sachant par ailleurs que le blanc d'œuf est habituellement commercialisé à pH de 9,0 à 9,1. Ces variations sont en fait directement liées à la quantité de CO₂ perdu par l'œuf, cette perte étant elle-même dépendante de la température de l'œuf et de la quantité de dioxyde de carbone présent dans son environnement (Copin *et al.*, 1994).

I.7.6.2.3. Le jaune d'œuf liquide (JOL)

Après la séparation du blanc on récupère le jaune liquide, Le jaune d'œuf obtenu par cassage manuel d'une teneur en matière sèche comprise entre 51,8 et 52%, et ce de façon très constante. L'âge de l'œuf, c'est-à-dire la quantité d'eau ayant migré du blanc vers le jaune, est le seul facteur affectant significativement la teneur initiale en matière

sèche du jaune. En revanche, la teneur en matière sèche du jaune d'œuf issu d'une machine à casser est toujours inférieure à cette valeur et peut varier de 42 à 48% selon le matériel et sa cadence d'utilisation, l'âge et la taille de l'œuf. Toutefois, la plupart du jaune d'œuf est commercialisé après standardisation à 43-44% de matière sèche.

Le pH du jaune d'œuf pur est environ de 6,0 et ne change que très peu au cours du vieillissement de l'œuf coquille, car il contient très peu de CO₂. Le jaune d'œuf obtenu industriellement, et qui contient de ce fait un peu de blanc d'œuf, présente un pH légèrement supérieure, voisin de 6,5 lorsque la teneur en matière sèche est de 44%

La couleur du jaune d'œuf peut constituer un critère de commercialisation dont il faudra s'assurer la maîtrise par le tri des élevages d'origine et de l'alimentation qu'ils utilisent (**Copin et al., 1994**).

I.7.7. Microbiologie des œufs

Les œufs sont habituellement considérés stériles à l'intérieur de la coquille, à moins que l'animal ne soit malade. Le contenu de l'œuf est protégé par la coquille, par les membranes protectrices à l'intérieur de l'œuf et par des inhibiteurs chimiques dans l'albumen de l'œuf, ils disposent d'un arsenal remarquable de défenses destinées à préserver l'embryon de toute invasion microbienne au cours de son développement, mais il peut toutefois être contaminé par une flore diversifiée contenant des microorganismes d'altération et parfois pathogènes (**Burley, 1990 : Baron et Jan, 2010**).

Après cassage, les ovoproduits subissent différentes opérations de séparation, de transformation et/ou de stabilisation, en fonction de leur destination : pasteurisation, sucrage, salage, congélation, concentration, séchage. Ces opérations ont un effet stabilisant, soit par destruction, soit par inhibition du développement des microorganismes présents.

Les micro-organismes qui pourraient contaminer les œufs doivent être capables de traverser ces barrières et ensuite de poursuivre leur croissance à l'intérieur. La pénétration des micro-organismes dans la coquille est plus facile quand la coquille est humide, car les pores de la coquille permettent les échanges gazeux. Après la ponte, la température de l'œuf passe de 40 °C à la température ambiante, la différence de

température crée une force de succion qui permet l'entrée des microorganismes à l'intérieur. Si l'œuf n'est pas proprement nettoyé et entreposé, la pénétration peut être rapide et la détérioration est alors possible (**Messens *et al.*, 2005**).

Durant les étapes de préparation, les œufs liquides sont sujets aux contaminations provenant des micro-organismes présents sur la coquille, sur les équipements, sur les mains et les vêtements des manipulateurs, dans les ingrédients ajoutés et dans l'emballage final. Les analyses microbiologiques faites sur des coquilles d'œuf ont révélé la présence de moisissures : *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Rhizopus* et *Mucor*, de levures: *Rhodotorula*, et de bactéries: *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Proteus*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella* (**Humphrey *et al.*, 1994 ; Okamura *et al.*, 2001; De Reu *et al.*, 2006 ; Gast *et al.*, 2007**). La pourriture noire des œufs se retrouve dans les œufs entreposés à 20 °C. Elle est causée par *Proteus* et *Aeromonas*, ayant réussi à pénétrer par la force de succion. En plus du noircissement, il y a formation d'un gaz le sulfure d'hydrogène (H₂S), qui a une odeur de putréfaction. La pourriture blanche des œufs est due à *Citrobacter*, *Salmonella* et *Alcaligenes*, dont la croissance rend le blanc terne et incolore. *Pseudomonas fluorescens* laisse l'œuf plutôt blanchâtre avec production d'acidité ; sa détection est faite par la fluorescence de l'intérieur de l'œuf. La formation d'une décoloration rougeâtre de l'œuf est causée par *Serratia marcescens* et elle est accompagnée d'une odeur de putréfaction. La pourriture blanche est causée par *Citrobacter* et *Proteus vulgaris*, le jaune devient épais et il y a des pigments vert-olive qui apparaissent ; le blanc devient d'une couleur orangée. Une fois que la coquille de l'œuf est cassée, il peut se produire d'autres types de défauts causés par les micro-organismes décrits plus haut comme des odeurs désagréables, le développement d'acidité et la putréfaction. Malgré tout, l'œuf peut se protéger contre l'invasion de certains micro-organismes ; en effet, à l'intérieur se retrouve une enzyme, le lysozyme, qui peut détruire la paroi cellulaire de certains micro-organismes qui ont su franchir les barrières naturelles de l'œuf (**Nau *et al.*, 2003**).

I.7.7.1. Les bactéries psychrotrophes

La conservation des denrées alimentaires par l'emploi de la technique de la réfrigération connaît un important essor, notamment dans le domaine des plats cuisinés, au détriment des procédés de congélation et surtout d'appertisation. L'intérêt de la

réfrigération est de ne pas induire de modification organoleptique des produits alimentaires, alors que les autres procédés physiques ne conservent pas toujours aux denrées un aspect de produits frais. L'amélioration constante des performances techniques des moyens frigorifiques de transport et d'entreposage, ainsi que la mise au point de techniques nouvelles d'élaboration et de conditionnement des produits ont favorisé la commercialisation de produits réfrigérés dont la durée de conservation peut atteindre plusieurs semaines voire plusieurs mois. Cette évolution technologique fait actuellement l'objet d'une large remise en cause. La recherche d'une conservation très prolongée des produits contribue à réaliser la sélection de flores microbiennes spécifiques, qualifiées de psychrotrophes.

I.7.7.1.1. Définition des bactéries psychrotrophes

Les bactéries psychrotrophes sont définies sur la base de leurs caractéristiques spécifiques en matière de thermosensibilité (**Tableau 6**). Elles sont définies par leur aptitude à se développer à des températures inférieures à +7 °C et caractérisées par une croissance permettant la production de colonies sur gélose à 7 °C en 10 jours. Agents de toxi-infections alimentaires ou d'altération de la qualité marchande des denrées, elles constituent un facteur limitant la conservation des produits réfrigérés (**Bornert, 2000 ; Branger, 2007**).

La maîtrise de ce type de flore passe principalement par une amélioration des performances des moyens frigorifiques, permettant de garantir une réfrigération des denrées entre 0 °C et +2 °C, ainsi que par une validation de la durée de vie des produits alimentaires sur la base d'études scientifiques adaptées (**Bornert, 2000**).

Tableau 6 : Bactéries et température de croissance (**LEYRAL et VIERLING 1997**).

Groupe	Température Minimale	Température Optimale	Température Maximale
<i>Psychrotrophes</i>	0 à 5 °C	25 à 35 °C	37 °C

Indépendamment de ces considérations relatives à la température optimale de croissance, il est d'usage de qualifier de psychrotrophes les micro-organismes qui conservent une activité notable à des températures inférieures ou égales à +7 °C (**Rozier, 1995 ; Catteau, 1999**). Selon cette définition, les bactéries psychrophiles

appartiennent aussi au groupe des psychrotrophes, mais en pratique les principales bactéries psychrotrophes d'intérêt alimentaire sont mésophiles. Il faut noter que le monde des micro-organismes psychrotrophes ne se limite pas aux seules bactéries. On rencontre aussi un nombre très important d'espèces de micromycètes, agents de l'altération au froid des denrées alimentaires.

A des températures proches de 0 °C, les micro-organismes subissent des désordres métaboliques et des lésions cellulaires pouvant être importants. Cet état physiologique de "stress froid" (**Druésne, 1996b**) est principalement la conséquence d'une fragilisation des liaisons hydrophobes, induite par la réfrigération. Il en résulte une perte de fonctionnalité des protéines enzymatiques, par modification de leur conformation dans l'espace. La structure quaternaire est profondément modifiée, avec une dissociation des complexes polymériques. L'assemblage des ribosomes est inhibé, ce qui provoque une diminution des synthèses protéiques. La fluidité des membranes est réduite et l'ensemble des fonctions membranaires telles que le transport des ions ou des nutriments s'en trouve affecté (**Gounot, 1991**). Les bactéries psychrotrophes possèdent une relative capacité de résistance au «stress froid», mettant en jeu des mécanismes dont les principaux sont la synthèse d'enzymes adaptées à fonctionner à basse température, l'adaptation de la composition des membranes en acides gras insaturés et la synthèse de protéines «de choc thermique» (**Gounot, 1991 et Druésne, 1996a**).

Des écarts très faibles de température peuvent avoir une incidence notable sur l'activité de la flore psychrotrophe. Ainsi, si une température de +2 °C exerce un effet inhibiteur très net, une activité bactérienne très significative peut être constatée dès +4 °C. Il faut aussi noter que les différentes capacités métaboliques ne subissent pas toutes une inhibition identique. Ainsi, à +4 °C, les *Pseudomonas* ont une croissance lente mais présentent une importante activité de synthèse d'enzymes qui réalisent l'hydrolyse du substrat alimentaire (**Bourgeois et al., 1996**).

Les bactéries psychrotrophes présentent une sensibilité particulière au stress «chaud», caractérisée en particulier par une température maximale de croissance inférieure à +45°C et une température létale inférieure à +50 °C. On peut ainsi citer les températures limites de croissance suivantes : +35 °C pour *Acinetobacter*, +40 °C pour *Alcaligenes*, +43 °C pour *Pseudomonas* et +45 °C pour *Listeria monocytogenes* (**Larpen, 1995**).

En ce qui concerne l'influence du pH, il faut noter que la plupart des bactéries psychrotrophes sont neutrophiles. Seules font exception à cette règle les bactéries lactiques et *Listeria monocytogenes* qui tolèrent des pH acides jusqu'à une valeur limite de 5 (Larpen, 1995). Le genre *Pseudomonas* est très exigeant en eau libre et ne se développe bien que pour des valeurs d'activité de l'eau (a_w) supérieures à 0,98 (Bourgeois *et al.*, 1996). Au contraire, *Listeria monocytogenes* résiste à des conditions hostiles. Elle tolère jusqu'à 10% de chlorure de sodium (Larpen, 1995) et son a_w limite de croissance est de 0,86.

Il faut enfin retenir la forte production de bactériocines (antibiotique naturel) par les lactobacilles, qui intervient dans les phénomènes de compétitions bactériennes.

Baron *et al.* (2007) ont étudié le comportement, dans de l'OEL, d'une souche psychrotrophes appartenant au groupe *Bacillus cereus* isolée d'un lot d'OEL altéré. La population bactérienne augmente de 2 unités logarithmiques après 7 jours à 8 °C et 14 jours à 6 °C, contre 4,5 unités logarithmiques à 10 °C en moins de 7 jours. En revanche, aucun développement n'est observé à 4 °C.

I.7.7.1.2. Influence des bactéries psychrotrophes sur la conservation des denrées alimentaires

De nombreux types d'altérations des denrées dues à l'action de bactéries psychrotrophes ont été décrits. Ils sont le résultat de l'activité d'enzymes microbiennes exocellulaires et affectent, selon les cas, la consistance, la couleur, l'aspect, l'odeur et la saveur du produit.

Exemple pour les bactéries du groupe *Bacillus cereus* qui occupent une place de premier plan parmi les micro-organismes préjudiciables à la filière ovoproducts en raison de leur ubiquité et de leur capacité à résister sous forme de spore aux barèmes de pasteurisation pratiqués dans les industries (Payne *et al.*, 1979). De plus, certaines souches de ce groupe sont psychrotrophes et peuvent se développer au cours du stockage des ovoproducts à faible température (Andersson *et al.*, 1995). Or, le danger engendré par ce groupe de bactéries est de deux natures : elles ont la capacité de produire des enzymes et des toxines, respectivement susceptibles d'altérer la qualité

des produits, et d'engendrer des possibilités de maladie alimentaire (**Granum et al., 1996**).

a) Protéolyse et lipolyse

La protéolyse conduit à la formation d'acides aminés libres puis de produits de leur décarboxylation ou de leur désamination. Les amines volatiles et l'ammoniac formés sont à l'origine d'odeurs et de saveurs désagréables et exceptionnellement d'une toxicité de l'aliment. Ce type de métabolisme est rencontré en particulier chez les bactéries des genres *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* et *Flavobacterium*, mais aussi chez les *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Bacillus* et les entérobactéries. A l'exception des lactobacilles, ces différentes bactéries se caractérisent aussi par une activité lipolytique importante. La lipolyse conduit à la libération d'acides gras libres. Elle modifie les propriétés technologiques et gustatives des graisses, avec apparition du goût de rance, et favorise le phénomène d'oxydation des acides gras insaturés en méthylcétones. Si de nombreuses bactéries psychrotrophes sont très facilement détruites lors d'un traitement par la chaleur, les lipases et surtout les protéases sont pour la plupart beaucoup plus thermorésistantes. Certaines résistent quelques dizaines de secondes à des températures de +140 à +150 °C et ne seront donc pas détruites, par exemple, lors de la stérilisation du lait (**Mahieu, 1984**).

b) Autres types d'altérations

Parmi les autres types d'altérations, on peut aussi citer (**Bornert, 2000**) ;

- les modifications de la consistance du produit, notamment par production d'exopolysaccharides à l'origine par exemple d'une consistance filante des laits décrite avec les genres *Micrococcus* et *Alcaligenes* ;
- les phénomènes d'acidification, par fermentation des sucres, activité caractéristique du groupe des bactéries lactiques, soit les genres *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Lactococcus*. Lors de processus hétérofermentaire, la formation de gaz, d'aldéhydes et de cétones est à l'origine de modifications du goût et de l'odeur du produit.
- l'apparition de colorations, d'odeurs et de saveurs anormales dont quelques exemples figurent dans le **Tableau 7**.

Au plan macroscopique, le type d'altération observé varie, d'un produit à un autre, en fonction de la nature et de l'importance de la contamination microbiologique initiale et des conditions écologiques offertes à cette flore, du fait de la composition de la denrée : aw, nature des principaux constituants, pH, potentiel d'oxydoréduction...

De ce fait, certains produits alimentaires réfrigérés ne constituent pas, par nature, un substrat favorable à la croissance des bactéries psychrotrophes, en particulier les laits fermentés. Pour ces produits, les agents d'altérations seront alors non pas des bactéries mais des micromycètes beaucoup plus tolérants à des conditions extrêmes d'environnement telles que l'acidité des yaourts.

Tableau 7 : Exemples d'altérations des denrées par des bactéries psychrotrophes (**Bornert, 2000**).

Produit concerné	Modification constaté	Agent
Lait	Coloration bleu	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Beurre	Couleur verte	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Toutes denrées	Amertume	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Enterococcus faecalis</i>
Toutes denrées	Gout fruité (« de fraise »)	<i>Pseudomonas fragi</i>

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

II.1. Matériel végétal

Nous avons réalisé un échantillonnage sur les agrumes cultivés à la Station Expérimentale dépendant de l'Institut des Techniques d'Arboriculture Fruitière de Boufarik (ITAF). En fonction de leurs critères botaniques mais également de leur intérêt économique, nous avons sélectionné la variété d'agrumes suivante :

Espèce : Citrus sinensis (L.) Osbeck.

Variété : Valencia Late

Dénomination usuelle du fruit : Orange douce

II.2. Extraction des huiles essentielles

II.2.1. L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (ESSAM)

Les extractions sans solvant assistées par micro-ondes ont été réalisées dans un four micro-ondes ménager puis validées avec le four micro-ondes de laboratoire Dry Dist commercialisé par la société Milestone (Italie). Les deux fours ont les mêmes caractéristiques :

- Cavité multimode
- Fréquence de 2450 MHz
- Magnétrons délivrant une puissance maximale de 800 W

Le montage élaboré est présenté dans la **Figure 27**. Il est constitué d'un réacteur placé dans l'enceinte du four micro-ondes surmonté d'une colonne assurant la liaison avec la partie du montage située à l'extérieur de la cavité du four. Le système de condensation des « vapeurs aromatiques » est composé d'un réfrigérant à boules, relativement long orienté verticalement afin de respecter l'orientation initiale du flux de vapeur provenant du réacteur, d'assurer une condensation maximale des vapeurs saturées en molécules aromatiques et d'obtenir un condensât le moins chaud possible pour éviter une dégradation thermique éventuelle des molécules aromatiques. L'orientation verticale du réfrigérant a nécessité de placer le retour du piège de vapeur directement à la sortie du four situé entre le réfrigérant et le réacteur. Elle permet au mélange « vapeur d'eau – huile essentielle » de se diriger vers le réfrigérant afin d'être

condensé avant d'être piégé, puis de se diriger vers l'essencier équipé du système de cohobation.

Le protocole expérimental de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes s'articule autour de trois points importants :

- la qualité de la matière végétale traitée,
- la puissance micro-ondes appliquée,
- la durée totale de l'extraction.

La quantité de matière végétale a été fixée de manière à obtenir une quantité d'huile essentielle suffisante pour une séparation par simple décantation, le but de ce protocole étant d'éviter l'usage de solvant organique afin d'obtenir le produit le plus « propre » possible.

Pour les variétés d'agrumes étudiées, le protocole expérimental est identique : 200g d'écorces râpées fraîches à l'aide d'un robot électrique sont introduites, sans ajout d'eau ni de solvant organique, dans un réacteur de type ballon d'une contenance de 500 ml placé dans la cavité multimode du four micro-ondes présenté dans la **Figure 27**.

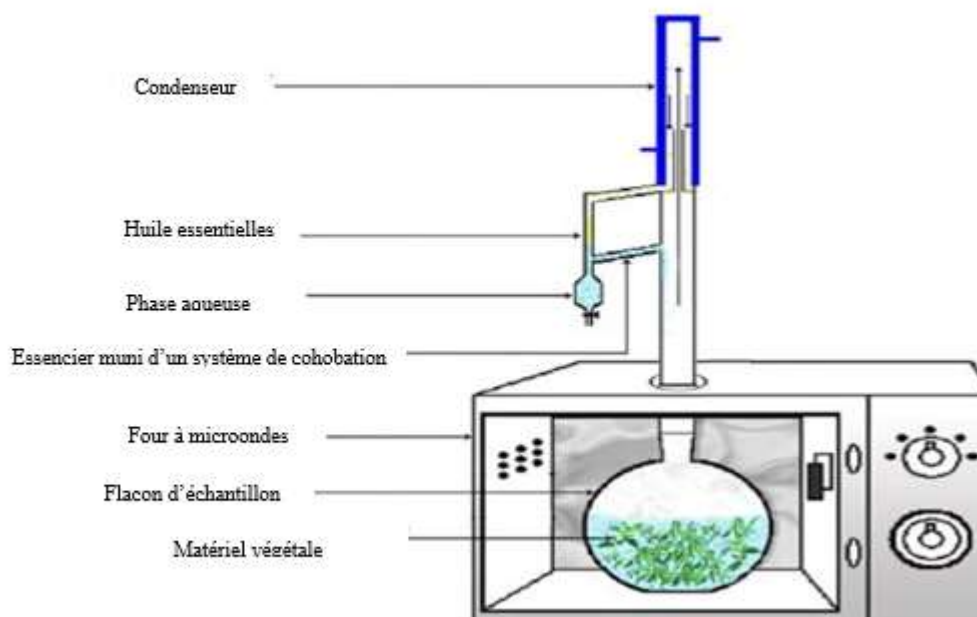


Figure 27 : Schéma du montage expérimental de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes.

La durée de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes a été fixée après les observations de la cinétique d'extraction de l'huile essentielle. Il est apparu qu'après trente minutes d'extraction, l'huile essentielle est pratiquement extraite et le flavedo vidé de ses essences. La durée totale d'une extraction sans solvant assistée par micro-ondes a donc été fixée à dix minutes comprenant l'étape de chauffage comme l'indique le **Tableau 8**.

Grâce au système de cohobation, le taux d'humidité au sein du ballon reste constant tout au long de l'extraction. La température initiale au sein du réacteur est voisine de la température ambiante du laboratoire soit 20 °C. Par la suite, grâce au chauffage, la température de la matrice augmente jusqu'à atteindre la température d'ébullition de

l'eau 100°C. Les expériences d'extraction sans solvant assistée par micro-ondes menées lors de ce travail sont exclusivement réalisées à pression atmosphérique. L'huile essentielle obtenue est séparée de l'eau par simple décantation. Aucun solvant organique n'est utilisé au cours de ce protocole.

L'huile essentielle est au préalable placée sur desséchant de type sulfate de sodium (Na_2SO_4), afin d'éliminer toute trace éventuelle d'eau, puis pesée afin de calculer le rendement de l'extraction par rapport à la masse du fruit entier. Les huiles essentielles sont conservées au réfrigérateur à l'abri de la lumière et à une température de 4 °C.

La puissance micro-ondes appliquée lors de l'extraction sans solvant assistée par chauffage micro-ondes est obligatoirement fonction de la quantité de matière végétale à traiter. Ainsi nous parlerons plutôt de densité de puissance avec cependant une puissance limite applicable de 1000 Watts compte tenu des paramètres fournis par le constructeur. Cette grandeur représente la quantité de puissance appliquée en Watts par kilogramme de matériel végétal traité, sachant que l'extraction d'un point de vue thermique se déroule en deux parties : la première étant consacrée au chauffage proprement dit et où la température doit atteindre le palier de 100 °C (température d'ébullition de l'eau), la seconde étant dévolue à l'extraction se déroulant à 100°C température de distillation des molécules organiques aromatiques.

A la suite de multiples expériences préliminaires sur les écorces des variétés étudiées, tous ces paramètres ont été fixés (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Conditions opératoires de l'ESSAM.

Type de végétales	variétés de Citrus (écorces)	
Masse initiale (g)	200	
Pourcentage d'humidité (%)	95	
Réacteur	De type ballon, contenance de 500 ml	
Puissance MO (W)	800	
Durée totale de l'extraction (min)	10	
Séparation	par simple décantation sans ajout de solvant	
Séchage	sur Na ₂ SO ₄ anhydre	
Pesée OHAUS	sur balance de précision : Analytical Plus	
Rendement (%)	masse huile essentielle / Masse du fruit entier	
Conservation	à l'abri de la lumière, à une température de 4 °C	
Analyse	CG	CG/SM

II.2.2. L'extraction par hydrodistillation (HD)

L'extraction par hydrodistillation a été réalisée par un appareil de Clevenger modifié (**Clevenger, 1928**) à pression atmosphérique. Le schéma du montage utilisé est présenté dans la **Figure 28**. Afin de mettre en place un protocole applicable aux variétés choisies et d'optimiser les rendements de l'extraction tout en conservant la qualité de l'huile essentielle, plusieurs expériences préliminaires ont été menées. La charge de matière végétale traitée, la durée de l'hydrodistillation, ainsi que la quantité d'eau à utiliser sont les paramètres qui ont été optimisés au fil des expériences dans le but de trouver le meilleur compromis.

Pratiquement, pour chaque variété étudiée (**Tableau 9**), 200g d'écorces râpées et fraîche sont introduits dans le ballon, accompagnés de 2 litre d'eau distillée, puis chauffés pendant 3 heures après obtention de la première goutte d'huile essentielle.

Grâce au système de cohobation, la quantité d'eau au sein du ballon est quasiment la même tout au long de la distillation. L'huile obtenue est séparée de l'eau par simple décantation. Aucun solvant organique n'est utilisé au cours de ce protocole. L'huile essentielle est au préalable placée sur desséchant de type sulfate de sodium, afin d'éliminer toute trace éventuelle d'eau, puis est pesée afin de calculer le rendement de l'extraction par rapport à la masse du fruit entier. Les huiles sont conservées au réfrigérateur à l'abri de la lumière et à une température de 4 °C.

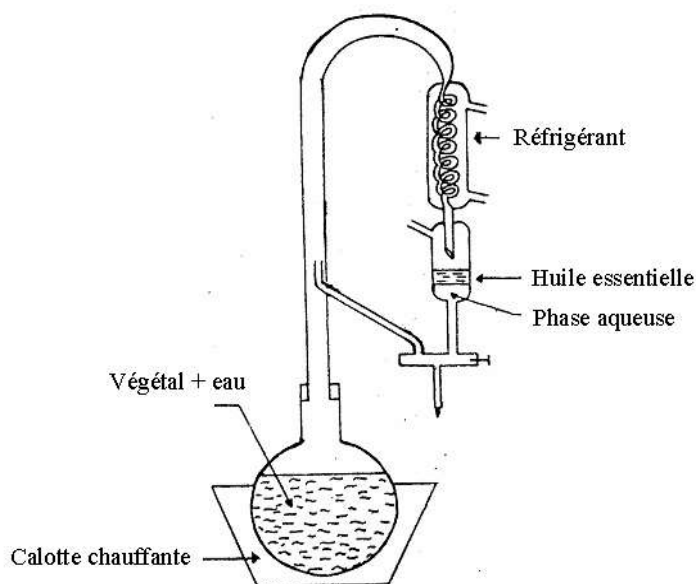


Figure 28 : Schéma du montage d'hydrodistillation sur un appareil de Clevenger modifié.

Tableau 9 : Conditions opératoires de HD.

Type de végétales	variétés de Citrus (écorces)	
Masse initiale (g)	200	
Pourcentage d'humidité (%)	95	
Réacteur	de type ballon, contenance de 2,5 L	
Chauffage	chauffe ballon électrique de puissance 1000 W	
Durée totale de l'extraction (min)	180	
Séparation	par simple décantation sans ajout de solvant	
Séchage	sur Na ₂ SO ₄ anhydre	
Pesée OHAUS	sur balance de précision : Analytical Plus	
Rendement (%)	masse huile essentielle / Masse du fruit entier	
Conservation	à l'abri de la lumière, à la température de 4 °C	
Analyse	CG-FID	CG/SM

II.2.3. L'extraction par expression à froid (CP)

Les fruits sont lavés à l'eau pour éviter une éventuelle contamination. Les agrumes provenant d'une plantation peuvent transporter jusqu'à 500 000 micro-organismes par cm² (Di Giacomo, 1978). Les huiles essentielles d'écorces réparties dans les cellules oléifères sont obtenues par expression à froid à l'aide d'un appareil d'extraction semi industriel (BREVET SCHAUB). Chaque fruit préalablement pesé et lavé est placé dans l'appareil d'extraction qui le fait tourner sur lui-même. Une aiguille racle le péricarpe afin de percer les poches contenant les essences. Les huiles essentielles sont alors recueillies grâce à un filet d'eau, centrifugées pour enlever les matières solides et pectines puis desséchées par du sulfate de sodium afin d'éliminer toute trace éventuelle d'eau. L'essence recueillie est alors pesée afin de calculer le rendement de l'extraction par rapport à la masse du fruit entier. Les huiles sont conservées au réfrigérateur à l'abri de

la lumière et à une température de 4°C. Le **Tableau 10** résume les conditions opératoires de l'expression à froid.

Tableau 10 : Conditions opératoires de l'expression à froid.

Type de végétales	variétés de Citrus (fruit entier)	
Masse initiale (kg)	1	
Pourcentage d'humidité (%)	95	
Durée totale de l'extraction (min)	60	
Séparation	par centrifugation	
Séchage	sur Na ₂ SO ₄ anhydre	
Pesée OHAUS	sur balance de précision : Analytical Plus	
Rendement (%)	masse huile essentielle / Masse du fruit entier	
Conservation	à l'abri de la lumière, à une température de 4 °C	
Analyse	CG	CG/SM

II.3. Analyse par Chromatographie en phase Gazeuse (CG) et Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG/SM)

Les huiles essentielles récupérées par les trois procédés ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse seule sur appareil de marque Hewlett Packard 6890 et par couplage de celle-ci à la spectrométrie de masse (appareil Hewlett Packard 5973A). Deux colonnes capillaires, l'une polaire (Stabilwax) et l'autre apolaire (HP5 MS), ont été utilisées. Les **Tableau 11** et **Tableau 12** résume les Conditions opératoires des analyses en chromatographie.

Tableau 11 : Conditions opératoires des analyses en chromatographie en phase gazeuse.

Paramètres		
Colonne capillaire	HP5 MS	Stabilwax
Longueur	30 m	60 m
diamètre interne	0,25 mm	0,25 mm
épaisseur de phase	0,25 µm	0,25 µm
Température du détecteur (FID)	320°C	320°C
Gaz vecteur	Azote	Azote
Débit	0,3 ml	0,3 ml
Température de l'injecteur	250°C	250°C
Programmation du four	2°C/min de 60°C à 280°C 8 min à 60°C 15 min à 280°C	2°C/min de 60°C à 280°C 8 min à 60°C 15 min à 280°C
Concentration des échantillons	pur	pur
Quantité injectée	1 µl	1 µl
Mode d'injection	Split 1 :20	Split 1 :20

Tableau 12 : Conditions opératoires des analyses en CG/SM.

Paramètres		
Mode de détection : Impact électronique		
Courant d'ionisation	70 eV	70 eV
Colonne capillaire	HP-5MS	Stabilwax
Longueur	30 m	60 m
diamètre interne	0,25 mm	0,25 mm
épaisseur de phase	0,25 µm	0,25 µm
Gaz vecteur	Hélium	Hélium
Débit	0,7 ml	0,3 ml
Pression en tête de colonne		
Pression (source, analyseur)	10 ⁻⁷ mbar	10 ⁻⁷ mbar
Température d'interface	280°C	280°C
Température de l'injecteur	250°C	250°C
Programmation du four	2°C/min de 60°C à 280°C 8 min à 60°C 15 min à 280°C	2°C/min de 60°C à 280°C 8 min à 60°C 15 min à 280°C
Concentration des échantillons	pur	pur
Quantité injectée	0,1 µl	0,1 µl
Mode d'injection	Split 1 :20	Split 1 :20

La préparation de la table des n-alcanes pour la mesure des indices de Kovats des composés identifiés dans les huiles essentielles a été faite comme suit : Solution des n-alcanes de C₈ à C₂₆ (origine : Aldrich et Fluka Chemicals) à 5% dans le pentane. Soit 0,1 g de chaque alcane dans 20 ml de pentane, conservé au réfrigérateur. L'identification des composés a été effectuée par comparaison de leurs indices de rétention (indices de Kovats) et des spectres de masse ions-fragments caractéristiques

obtenus expérimentalement à ceux cités dans la littérature (Adams, 2007) et/ ou inventoriés dans les banques de bibliothèques spectrales (Wiley7, Nist 2002).

II.4. Analyses physico-chimiques

II.4.1. Détermination du taux d'humidité

Le taux d'humidité de la matière végétale a été déterminé par la méthode physique de peser et disication en introduisant 10 g broyés d'échantillon et placés dans une coupelle tarée, elle-même positionnée dans une étuve réglée à $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Les échantillons sont ensuite pesés avec précision toutes les vingt-quatre heures, après avoir été refroidis à température ambiante dans un dessiccateur, et ce jusqu'à obtention d'un poids constant.

II.4.2. Rendement en huile essentielle Rdt HE

Le rendement en huile essentielle est estimé par le rapport des masses de l'huile essentielle et de la matière végétale séchée. Il est exprimé en pour cent (%).

$$\text{Rdt}_{\text{HE}} = \frac{M_{\text{HE}}}{M_{\text{VS}}} \times 100$$

Où :

- Rdt_{HE} : Rendement en huile essentielle (%) ;
- M_{HE} : Masse de l'huile essentielle (g) ;
- M_{VS} : Masse de la matière végétale sèche (g).

II.4.3. Mesure de la densité selon la norme NF T 75-111

Elle est effectuée à l'aide d'un pycnomètre de volume 1ml à la température de 20 °C.

II.4.4. Mesure de l'indice de réfraction selon la norme NF T 75-112

A l'aide d'un réfractomètre de type Bellinghame permettant la lecture directe des indices de réfraction situés entre 1,3000 et 1,7000 avec une précision de $\pm 0,0002$.

Mode opératoire :

- régler le réfractomètre en mesurant les indices de réfraction des produits étalons (eau distillée, d'indice de réfraction 1,3330 à 20 °C).
- vérifier que le réfractomètre est maintenu à la température à laquelle les lectures doivent être effectuées, la température de référence étant de 20 °C.
- placer l'échantillon pour essai dans le réfractomètre, attendre que la température soit stable, puis effectuer la mesure.

II.4.5. Mesure du pouvoir rotatoire : NF T 75-113

A l'aide d'un polarimètre de type JASCO 1010 (réglé de façon à donner 0° et 180° avec l'eau).

- source lumineuse (lampe à vapeur de sodium), permettant d'obtenir une lumière de longueur d'onde 589,3 nm ± 0,3 nm.
- tube d'observation, de 100 mm ± 0,5mm de longueur.

Mode opératoire :

- concentration en essence d'écorces : 0,25g/ 100 ml d'éthanol.
- remplir le tube avec l'échantillon pour essai, en s'assurant qu'il ne reste aucune bulle d'air interposée.
- placer le tube dans le polarimètre et lire l'angle de rotation de l'échantillon pour essai sur l'échelle de l'appareil.

II.4.6. Teneur en matière grasse

La teneurs en matières grasse des échantillons de l'œufs entier liquide (OEL), le blanc et le jaune ont été analysées selon la méthode de **Folch *et al.*(1957)**.

II.4.7. Le pH

La mesure du pH a été réalisée avec un pH-mètre pH-modèle 2001 (Crison Instruments, Barcelone, Espagne) en introduisant directement les deux sondes (pH et température) dans les échantillons après homogénéisation de 3 g du produit dans 27 ml de eau distillée pendant 10 s à 1300 tr / min en utilisant un macérateur Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, Staufen, Allemagne). Chaque valeur est la moyenne de trois déterminations.

II.4.8. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

L'activité antioxydante de l'huile essentielle d'orange a été évaluée par la méthode **SR-TBA** et la méthode de l'activité anti-radicalaire au radical DPPH• (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl).

II.4.8.1. Evaluation de la stabilité oxydative ; Test des substances réactives à l'acide thiobarbiturique SR-TBA

Cette méthode permet de quantifier la peroxydation lipidique, dans le plasma et les aliments, en mesurant la libération du malondialdéhyde (MDA), un des produits majeurs de dégradation des lipides (**Botsoglou *et al.*, 1994**). Le MDA réagit avec l'acide thiobarbiturique pour donner des pigments de coloration rouge mesuré à une longueur d'onde de 532 -535 nm.

Pour mesurer la capacité antioxydante potentielle de l'HE étudiée et pour évaluer l'extension de l'oxydation lipidique sur les échantillons d'OEL, on a entrepris la détermination de la quantité de substances réactives à l'acide 2-thiobarbiturique formées (SR-TBA), selon un protocole développé par **Djenane *et al.* (2012b)**. Un volume (9 ml) de L'OEL a été prélevé dans un tube à essai de 50 ml et homogénéisé dans 20 ml d'acide trichloroacétique (10%) avec un Ultra Turrax Mixer T25 (Janke & Kunkel, Staufen, Allemagne) et centrifugé à 4000 rpm pendant 15 minutes en utilisant une centrifugeuse Megafuge 1.0 (Heraeus Sepatech, Espagne). Une solution fraîche (20 mM) d'acide thiobarbiturique a été préparée. Le surnageant a été filtré à travers un papier filtre Whatman No. 1 (MN 640 W, Machinery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Allemagne). 2 ml du surnageant ont été recueillis et 2 ml de solution de TBA (20 mM) ont été ajoutés dans des tubes à essai. Les tubes ont été chauffés dans un bain marie (B. Braun, Melsungen, Allemagne) à 100 °C pendant 15 minutes puis refroidis pendant 20 min.

L'absorbance de la solution a été mesurée à 531 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible (Shimadzu UV-1603, Shimadzu, Kyoto, Japon) avec des témoins contenant 2 ml de H₂O déionisé et 2 ml de TBA.

Les résultats ont été exprimés en mg de MDA/kg de l'OEL et calculés en utilisant une courbe standard **ANNEXE 2**, préparée avec du 1, 1, 3,3-tétraméthoxypropane. Pour la courbe d'étalonnage de la MDA, nous préparons la gamme de concentration du MDA en utilisant la solution de TMP standard Malonaldehyde tétraméthyl acétal (Sigma,

Aldrich, Chemistry-GmbH, Allemagne) qui est un précurseur de MDA. L'évolution des valeurs de SR-TBA exprimées en mg de MDA/kg de l'OEL. Les moles/l ont ensuite été converties en mg/ kg suivant les formules :

$$A = 150093 C + 0,049 \quad (1)$$

$$C = (A - 0,049) / (150093) \quad (2)$$

$$\text{mg MDA/kg} = 2,96 \times [(A - 0,049) / 1,5] \quad (3)$$

A : est l'absorbance mesurée à 531 nm, 150093 ($1,5 \times 10^5$) est le coefficient d'extinction molaire.

C : est la concentration de TMP (moles/l), et 0,049 est la constante.

Le pourcentage de taux d'inhibition (**I%**) par rapport au contrôle a été calculé comme suit :

$$\mathbf{I\% = [(C (\text{échantillon}) - T (\text{échantillon})) / C (\text{échantillon})] \times 100}$$

C : est le nombre de SR-TBA dans les échantillons non traités OEL préparé sans addition HE : témoin et T est le nombre de SR-TBA dans les échantillons traités.

II.4.8.2. Test au DPPH

Le DPPH• 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 (**Gachkar et al., 2007**).

Dans ce test les antioxydants réduisent le diphényl picryl-hydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphényl picryl-hydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (**Sanchez-Moreno, 2002**).

Procédure expérimentale

L'activité antioxydante de l'huile essentielle extraite a été évaluée *in Vitro* par la mesure du pouvoir de piégeage du radical DPPH• comme un radical libre relativement stable.

Le protocole suivi est celui décrit par **Lagha-Benamrouche et Madani, 2013**. Avec des petites modifications. Une solution mère de départ a été préparée en dissolvant l'HE pure d'orange dans une solution à 5% (v/v) de diméthylsulfoxyde (DMSO), puis différentes dilutions ont été préparées pour obtenir à la fin des concentrations en HE allant de 50 à 450 µg/ml.

Cependant, la solution DPPH• a été fraîchement préparée tous les jours, stockée dans un flacon recouvert de papier d'aluminium et maintenue dans l'obscurité à 4 °C avant tout usage.

Dans des tubes à essai secs, une quantité de 4 ml de chaque dilution d'HE (50 à 450 µg/ml) a été mélangée avec 4 ml de solution de méthanol DPPH• (100 µg/l). Le mélange est bien homogénéisé à l'aide d'un mélangeur à vortex (Cyclo-mixer) puis maintenu à l'obscurité pendant 30 min à une température ambiante (25 ± 1 °C) pour que la réaction accomplisse. La diminution de l'absorbance des mélanges testés a été surveillée toutes les minutes pendant 30 min à 517 nm en utilisant un (spectrophotomètre Perkin-Elmer Lambda 25 UV / Vis). L'absorbance de méthanol pur a été aussi lue à 517 nm.

Détermination du pourcentage d'inhibition

Les résultats ont été exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire (AA) exprimée en pourcentages d'inhibition (%) calculée par la formule ci-dessous :

$$\% \text{ d'inhibition du DPPH}\cdot (\text{AA}\%) = [(\text{Abs}_{(\text{DPPH}\cdot)} - \text{Abs}_{(\text{HE})}) / \text{Abs}_{(\text{DPPH}\cdot)}] \times 100$$

Abs = absorbance à 517nm.

Tel que : **Abs_(DPPH•)** : Absorbance mesurée sur la solution méthanolique **DPPH•** témoin.

Abs_(HE) : Absorbance mesurée sur les échantillons contenant de l'HE d'orange.

Détermination d'IC₅₀ :

L'IC₅₀ est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande (Aghel et al., 2004).

Un antioxydant de synthèse ; l'hydroxytoluène butylé (BHT) a été préparé pour son effet sur le pouvoir anti-radicalaire comme témoin positif.

Pour normaliser les résultats de **DPPH•**, l'indice d'activité antioxydante (**AAI**), proposé par Scherer et Godoy (2009) a été aussi déterminé :

$$\text{AAI} = \text{DPPH}\cdot \text{ dans le mélange réactionnel } (\mu\text{g/ml}) / \text{IC}_{50} (\mu\text{g/ml})$$

L'activité antioxydante est considérée faible lorsque **AAI** < 0,5,

L'activité antioxydante est considérée moyenne lorsque 0,5 < **AAI** < 1,0,

Forte activité antioxydante lorsque 1,0 < **AAI** < 2,0

Et très forte lorsque **AAI** > 2,0.

4 ml de chaque dilution HE / DMSO (différentes concentrations)



Ajouter 4 ml DPPH (100 µg/l)



Incuber à l'abri de la lumière



Lire l'absorbance à λ=517

II.4.9. Évaluation de la couleur

La couleur est un attribut perceptif, subjectif, élaboré dans notre système visuel à partir de la lumière renvoyée par les objets et par leur environnement. La colorimétrie consiste en un ensemble de données et de méthodes permettant de quantifier la couleur objectivement. L'espace chromatique CIE $L^* a^* b^*$, défini par Commission Internationale de l'Eclairage (CIE), est un espace à trois dimensions approximativement uniforme du point de vue des écarts chromatiques (**Robertson, 1977**). Les trois coordonnées de CIELAB sont des correspondants de la Luminance (L^*), de la balance « vert-rouge » (a^*) et de la balance « jaune-bleu » (b^*) (**Figure 29**).

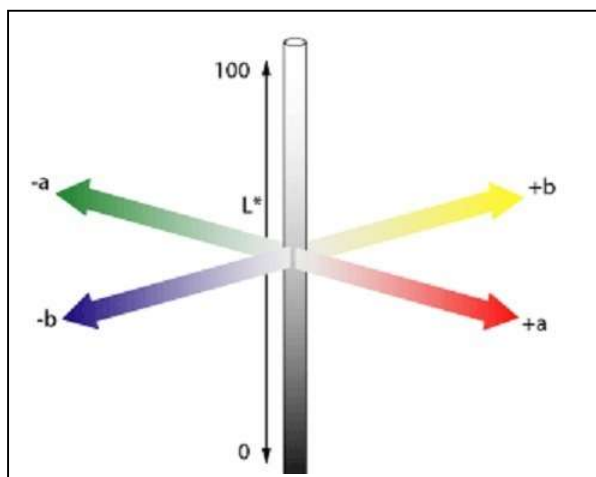


Figure 29 : Espace chromatique CIE $L^*a^*b^*$.

Le profil de couleur des OEL a été mesuré à l'aide des coordonnées de l'espace de couleur CIE (L^* , a^* et b^*) par un colorimètre (Mini XE, Portable type, USA) conformément aux recommandations de la Commission internationale sur l'illumination (**CIE, 1978**). L'instrument a été étalonné au départ à l'aide des étalons noir et blanc. Les échantillons ont été placés à l'intérieur des boîtes de Pétri en verre (diamètre et hauteur de 100×15 mm) en trois exemplaires, puis l'évaluation de la couleur a été déterminée sur six points (zones) différents en surface de chaque boîte de Pétri. La moyenne ($n = 18$) et l'erreur standard pour chaque paramètre ont été estimées.

II.5. Effets biopreservateurs sur les OEL

II.5.1. Préparation des OEL (Matériel d'origine animale)

Avant le début de l'expérimentation, les œufs ont été inspectés pour l'intégrité de la coquille, les œufs tachetés de sang, souillés ou fissurés ont été préalablement éliminés. Les œufs ont été désinfectés en surface par immersion pendant 1 min dans une solution diluée d'éthanol (70%) (**Djenane *et al.*, 2012b**). Lavés deux fois par immersion dans de l'eau distillée stérile, et laissés dans un endroit sec pour éliminer l'excès d'eau sur la surface jusqu'à utilisation *in vivo* "Essais".

Juste avant l'expérimentation, après le cassage des œufs on procède à la séparation, des blancs et les jaunes d'œufs dans des conditions aseptiques et recueillis dans des récipients stériles. Lorsque l'albumine a été séparée du jaune d'œuf, on a pris soin de s'assurer que l'albumine n'était pas contaminée par le contenu en jaune. Le pH des échantillons a été contrôlé avant de procéder aux expériences et les œufs ont été considérés comme frais lorsque le pH était d'environ $7,3 \pm 0,2$ pour le blanc d'œuf et de $6,3 \pm 0,2$ pour le jaune d'œuf. La chalaze a été éliminée et les fractions d'œufs séparées ont ensuite été homogénéisées pendant 2 min à 4000 tr/min, en utilisant un mélangeur commercial (31BL44, Waring, États-Unis).

Pour préparer 100 ml d'échantillons d'OEL, 33,25 ml de jaune d'œuf ont été mélangés avec 66,75 ml de blanc d'œuf ; cette proportion est la composition moyenne normale de l'œuf entier et a été utilisée pour atteindre une relation constante entre le blanc et le jaune. La proportion d'albumine et de jaune d'œuf affecte grandement les caractéristiques technofonctionnelles du produit durant les process technologiques et cette proportion se caractérise principalement par différents pourcentages d'humidité, teneur totale en matières solides et matières grasses (**Jin *et al.*, 2015**).

L'OEL total obtenu a été centrifugé à $103 \times g$ pendant 2 minutes en utilisant un (Heraeus Megafuge 1.0R) pour éliminer les poches d'air résiduelles. Les échantillons de l'OEL obtenus ont été répartis au hasard en cinq lots incluant des témoins. L'HE a été ajoutée directement dans plusieurs volumes de 50 ml de OEL à une concentration finale comprise entre 0,1 et 0,5%. Tous les échantillons ont été placés sous éclairage continu (1000 lux) (Promolux® Platinum L36w ; Market Group Ventures Inc., Shawnigan Lake, BC, Canada) dans des vitrines à $4 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 8 jours, simulant

des conditions réelles de vente au détail dans des vitrines illuminées. L'intensité lumineuse à la surface des échantillons OEL a été mesurée par un **luxmètre 810** (Chauvin Arnoux, Paris, France). Les positions des échantillons dans les vitrines (~ 80 cm sous le tube fluorescent) ont été repositionnées pour minimiser l'effet de la lumière abusive et les intensités de température à la surface du produit.

II.5.2. Analyse des bactéries psychrotrophes dans OEL

Dans notre étude, les échantillons sont préparés comme suit : un échantillon de 10 g a été pesé de manière aseptique et transféré dans un sac stomacher stérile contenant 90 ml d'une solution stérile d'eau peptoné (EP) (0,1%) et a été homogénéisé à température ambiante. Des dilutions décimales en série ont été préparées en solution EP (0,1%). Les dilutions appropriées ont ensuite été utilisées pour l'énumération des microorganismes. Le nombre total de bactéries psychrotrophes a été déterminé à l'aide d'un dénombrement sur boîte d'agar PCA après incubation à 7 °C pendant 10 jours (**ICMSF, 1986 ; Bornert, 2000 ; Branger, 2007**). La moyenne des résultats est exprimée en \log_{10} ufc/ml.

II.6. Analyse sensorielle

Les tests utilisés couramment dans les laboratoires pour l'analyse sensorielle des produits alimentaires comprennent l'étude de la différence, du classement par rang de l'intensité, de l'attribution des cotes d'intensité et les analyses descriptives (**Watts et al., 1991**). Les tests appliqués sur nos échantillons sont le test de comparaison par paire, et le test hédonique.

Les échantillons de l'OEL ont été évalués pour détecter l'odeur de fraîcheur, par un panel formé de six membres formés selon les directives de **Djenane et al. (2001)**. Trois séances de discussions ouvertes ont été organisées pour familiariser les membres avec les attributs et l'échelle utilisé. L'attribut "odeur d'HE" se réfère à l'intensité de l'odeur d'HE d'orange perceptible après l'ouverture de l'emballage contenant l'échantillon : 1 = aucune ; 2 = légère ; 3 = faible ; 4 = modéré ; et 5 = extrême. Les scores pour «mauvaises odeurs» se réfèrent à l'intensité des odeurs associées à la détérioration du produit : 1 = aucune ; 2 = légère ; 3 = faible ; 4 = modéré ; et 5 = extrême. Un score de 3 ou plus (≥ 3) dans les deux attributs indiquait que le produit est inacceptable pour la vente ou la consommation.

II.7. Détermination de *shelf life* du produit

Pour confirmer la détermination de *shelf life* (la durée de conservation) des OEL, l'analyse de l'effet d'un traitement avec de l'HE sur les attributs chimiques, microbiens et sensoriels a été estimée durant la période de stockage en vitrine illuminée. L'évolution des microorganismes liés à la détérioration et du degré d'oxydation a été comparée aux échantillons témoins (OEL sans HE). L'étude sur la durée de conservation a été réalisée sur une période de stockage d'une semaine, qui est la durée de vie actuelle appliquée aux OEL sans traitement thermique. Pour une étude sur la durée de conservation, des directives chimiques ont été utilisées suite aux recommandations de **Djenane et al. (2009)** pour les aliments d'origine animale : valeur SR-TBA : limite ~ 2 mg MDA/kg. Les directives microbiennes supplémentaires ont également été utilisées suite aux recommandations de **Gonzalez et al., 2009** pour l'œuf entier : $\sim 6 \log_{10}$ UFC / ml concernant le nombre seuil en flore psychrotrophes.

II.8. Analyses statistiques

Pour optimiser et évaluer la performance de l'ESSAM la procédure expérimentale de type **Box-Wilson** (*Plan Composite Centré PCC*) a été réalisée. Cette analyse permet d'utiliser la méthodologie des surfaces de réponses (**MSR**), qui repose sur l'élaboration d'une série de tests expérimentaux ayant pour but d'étudier l'impact des paramètres opératoires impliqués dans l'optimisation du procédé d'extraction par **ESSAM**. Cette étude multivariée permet, non seulement l'identification des conditions optimales de l'extraction, mais également la détermination des facteurs qui influencent le processus d'extraction, en minimisant le nombre d'expériences requis et en maximisant le rendement en métabolites ciblés, tout en offrant une complète exploitation du domaine expérimental étudié. Ce dernier pourra être représenté sous la forme d'un carré, lorsque deux facteurs sont sollicités, ou encore sous la forme d'un cube lorsque trois facteurs seront testés.

Trois variables ont été retenues comme pertinentes et sont définies ci-après :

- T : Temps requis pour effectuer l'étape d'extraction ;
- M : Masse de l'échantillon ;
- W : puissance du four à micro-ondes.

Les plans composites sont, parmi les plans du second degré, les plus employés. Ces plans présentent trois parties :

- **Le plan factoriel** : C'est un plan factoriel complet ou fractionnaire à deux niveaux par facteur. Les points expérimentaux sont aux sommets du domaine d'étude : carrée, cube ou hypercube.
- **Le plan en étoile** : Les points du plan en étoile sont sur les axes qui représentent les facteurs et ils sont en général tous situés à la même distance du centre du domaine d'étude. Cette distance est appelée *alpha* (α). Celle-ci joue un rôle important pour la qualité du modèle et ne pas être choisie au hasard.
- **Les points au centre du domaine d'étude** : on rajoute toujours des points expérimentaux situés au centre du domaine d'étude, et cela aussi bien pour les plans factoriels que pour les plans en étoiles. Ces points servent à obtenir une estimation de l'erreur expérimentale.

On a choisi exactement le plan central composite à faces centrées ou **CCFC** où les points en étoiles sont sur les faces du cube. la valeur codée d' α égale à l'unité.

Le nombre d'essais du plan factoriel n_f : 2^k

k = nombre de facteurs : 3

$$2^3 = 8 \text{ essais}$$

Le nombre d'essais du plan en étoiles n_α : $2k$

$$2 \times 3 = 6 \text{ essais}$$

Le nombre d'essais au centre n_0 : choisi par l'expérimentateur

Nous avons choisi 4 points au centre.

Le nombre total d'essais n :

$$n = n_f + n_\alpha + n_0$$
$$n = 8 + 6 + 4 = 18 \text{ essais}$$

Calcul des valeurs réelles des paramètres

Les variables codées appliquées aux valeurs naturelles des trois variables du **PCC** sont données au **Tableau 13**. Ces paramètres ont été étudiés de manière à optimiser la réponse à laquelle on s'intéresse, qui est le rendement maximum d'extraction.

Tableau 13 : Variables naturelles et codées, appliquées aux facteurs testés.

Facteur	Puissance	Temps	Masse
Unité	W	min	g
+ α	600	25	125
+1	600	25	125
0	450	20	100
-1	300	15	75
- α	300	15	75

Matrice d'expérience

La matrice d'expérience est le tableau qui indique le nombre et l'ordre des expériences à réaliser ainsi que la façon de faire varier les facteurs. Ce tableau est, donc, composé pour k facteurs de k colonnes, plus les colonnes d'interactions entre facteurs et 2^k lignes plus les lignes des points en étoiles et points centraux dans le cas du plan composite. Cette matrice a été obtenue à l'aide d'un logiciel statistique **STATGRAPHICS**, qui sert aussi à proposer un modèle mathématique idéal au phénomène étudié, puis il fait une analyse des résultats expérimentaux obtenus, en les comparant au modèle proposé.

-Pour la partie de l'application des HEs sur les OEL toutes les données ont été analysées selon la procédure du modèle linéaire général (**GLM**) du paquet statistique pour le logiciel des sciences sociales (SPSS version 21, IBM Corporation, États-Unis). Les résultats sont présentés comme une valeur moyenne de trois expériences indépendantes \pm écart-type avec trois répétitions. Le test t de Student a été utilisé pour comparer l'efficacité du traitement avec l'HE d'orange et pour déterminer les différences significatives entre les traitements à un intervalle de confiance de 95% ($p < 0,05$).

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES

En général, une procédure analytique des HEs extraites des plantes comprend deux étapes : extraction et analyse chimique au laboratoire. Bien que l'étape d'analyse soit réalisée pendant seulement 10 à 30 minutes, l'extraction prend au moins plusieurs heures. Elle se fait souvent par un chauffage prolongé avec de l'eau bouillante. L'extraction de l'HE de la matrice végétale consiste à transférer les composés chimiques dans l'eau bouillante suivie d'une distillation azéotropique, d'une condensation et enfin d'une séparation physique. Les HEs sont constituées non seulement des composés d'intérêts (majeurs et mineurs), mais aussi des composés co-extraits (par exemple de l'eau, des composés endogènes et d'autres contaminants) qui peuvent facilement interférer lors d'une analyse chimique au laboratoire. Il deviendrait nécessaire de les purifier, concentrer et les diluer. Avant toute analyse le choix de la technique d'extraction doit être le résultat d'un compromis entre l'efficacité, reproductibilité, la praticité, ainsi que des considérations de coût, du temps d'extraction, de degré d'automatisation et de sécurité. Tous ces facteurs ont permis, durant cette dernière décennie, d'opter pour des nouvelles techniques dites «*propres*» dans l'extraction des HEs, utilisant moins de solvants synthétiques et avec une moindre consommation d'énergie.

III.2. Extraction de l'huile essentielle d'orange douce « valencia late »

III.2.1. Rendement d'extraction

Les rendements obtenus par les deux méthodes, ESSAM et HD, sont similaires, mais la différence réside au niveau du temps d'extraction ($p < 0.05$). En utilisant la méthode d'extraction ESSAM, on obtient durant seulement 10 minutes d'extraction un rendement équivalent à 3 heures d'extraction par la méthode conventionnelle HD. Les rendements d'extraction sont respectivement, 0,40% pour les deux méthodes (ESSAM et HD) et 0,16% pour la méthode expression à froid (CP) (**Tableau 14**).

Tableau 14 : Rendement en huile essentielle de L’orange la variété Valencia late selon 3 méthodes d’extraction.

	Rendement de l’extraction (g HE/100g fruits)		
	ESSAM	HD	CP
Durée de l’extraction (min)	10	180	60
Rendement (%)	0,40	0,40	0,16

L’orange douce Valencia Late est la variété qui offre par ESSAM, HD et CP les plus importants rendements (0,40% ; 0,40% ; 0,16% respectivement) contre (0,24% en ESSAM, %, 0,21% en HD et 0,054% pour CP.

L’extraction par microondes sans solvant (ESSAM) est clairement plus rapide que ces homologues conventionnels. L’extraction a duré 10 min, tandis que des périodes de 1 heure et 3 heures ont été enregistrées pour CP et HD, respectivement. Dans le cas de CP, un temps additionnel de centrifugation (30 min.) de l’émulsion contenant l’HE pourrait être ajouté au temps d’extraction réel (1 h). Pour les cas d’extraction HD et ESSAM, la température d’extraction est égale à la température d’ébullition de l’eau à la pression atmosphérique (100 °C). Pour atteindre cette température d’extraction (100 °C) et ainsi obtenir la distillation de la première gouttelette d’HE, le temps de chauffage est de seulement 2 min. dans le cas d’ESSAM contre 30-40 min. pour HD. Du point de vue de la formation précoce des premières gouttelettes, les premières gouttelettes d’HE ont été observées après 3 minutes d’extraction avec la méthode ESSAM et 23 minutes par la méthode HD. Le transfert de chaleur durant les différentes techniques d’extraction était le facteur le plus important dans toutes ces différences (**Golmakani et Rezaei 2008a,b**). L’augmentation rapide de la température dans le cas de l’extraction par ESSAM est la principale raison de cette réduction du temps d’extraction (**Golmakani et Moayyedi, 2015**).

Dans un travail relativement récent, il a été déclaré que le rendement en HE obtenue à partir d’écorce de *C. sinensis* peut atteindre 1,89% (**Hosni et al., 2010**). Contre, toute attente, **Minh Tu et al. (2002)** ont déclaré un rendement de 0,13% pour la même espèce.

En outre, il faut souligner que l'un des rendements les plus élevés a été celui des oranges tardives de Valence (2,3%) (**Bustamente et al., 2016**). Un rendement de 0,79% a été aussi enregistré pour les oranges de la Colombie (**Blanco Tirado et al., 1995**). **Boukroufa et al. (2015)** ont constaté que les rendements d'HEs obtenus à partir d'écorces d'orange par hydrodiffusion à micro-ondes et par gravité (MHG) et par l'entraînement à la vapeur (SD) sont comparables, mais une différence n'est observée que dans le temps d'extraction. En effet, 15 minutes d'extraction avec ce procédé suffisent à extraire la totalité de l'HE alors qu'il faut 240 minutes avec SD qui est l'une des méthodes de référence dans l'extraction des HEs (gain de temps de plus de 93%). Les avantages en termes de réduction du temps dû aux micro-ondes ont également été rapportés par d'autres études telles que **Farhat et al. (2011)** pour l'écorce d'orange (12 min avec vapo-diffusion assistée par micro-ondes (MSDF) contre 40 min pour la vapo-diffusion (SDF). **Sahraoui et al. (2011)** en utilisant entraînement à la vapeur assisté par micro-ondes (MSD) : 3 h avec SD contre 6 min avec MSD, **Perino-Issartier et al. (2013)** pour l'HE de lavande (15 min avec MHG et 60 min avec HD) et **Sahraoui et al., (2008)** pour l'extraction de l'HE à partir de lavande avec MSD (6 min contre 40 min pour SD). L'extraction par la technique **ESSAM** est également meilleure par rapport à l'HD conventionnelle pour le cas de *Citrus grandis* (**Chen et al., 2016**). **Luciardi et al. (2016)** a constaté que les HE de mandarine obtenues par l'expression à froid suivies d'entraînement à la vapeur CP/SD contiennent des fractions monoterpéniques et sesquiterpéniques oxygénées plus que les HEs de mandarine obtenues par CP. Probablement, la SD, pourrait éliminer les huiles résiduelles dans les écorces et les drainer après le pressage et la séparation.

Les écorces fraîches du cultivar tardif de Valence en provenance d'Algérie ont donné un rendement en HE de 0,39% (**Ferhat et al., 2006**). Les HEs de *C. sinensis* (L.) Osbeck mosambi extraites à partir de l'épicarpe (sous-produit industriel de l'Inde) par HD produisant 1,8% d'HE en 5h (**Sharma et Tripathi, 2008**). La technique d'extraction **ESSAM** est considérée "respectueuse de l'environnement". Elle est une méthode très propre, qui évite la génération de résidus et l'utilisation d'une grande quantité d'eau. Son coût réduit est clairement avantageux en termes d'énergie et de temps. En ce qui concerne l'impact environnemental, la quantité calculée de dioxyde de carbone (CO₂) rejetée dans l'atmosphère est considérée plus élevée dans le cas HD 3464 g CO₂/g d'HE

et pour MAD (200 g CO₂/g d'HE (Ferhat *et al.*, 2006). Ces calculs ont été tirés à partir de la littérature scientifique : pour obtenir 1 kWh à partir de charbon ou de fuel, 800 g de CO₂ sont émis dans l'atmosphère lors de la combustion de l'énergie fossile (Bernard, 2001).

III.2.2. Composition des huiles essentielles d'orange douce (Valencia late) obtenues par ESSAM, HD et CP

Généralement, certaines HEs extraites à partir de *C. sinensis* ont été étudiées et, dans plusieurs cas, le cultivar, la variété ou l'organe ne sont pas indiqués. En terme de composants majeurs, la composition chimique des HEs traitées dans ce travail est en accord partiel avec la littérature scientifique (Espina *et al.*, 2011 ; Djenane, 2015).

Les dérivés terpéniques sont présents en très grand nombre dans les deux huiles essentielles de Citrus étudiées ; parmi eux, le limonène est le dérivé principal. La composition chimique des huiles essentielles de l'orange et citron variétés de Citrus est principalement constituée de composés hydrocarbonés, le limonène et le β-myrcène étant les plus abondants. La fraction oxygénée, très minoritaire, est principalement composée de linalol.

Selon la technique d'extraction utilisée, les HEs des citrus sont dominées par le limonène tandis qu'une importante variabilité a été observée dans les teneurs relatives à la fraction oxygénée. Nous remarquons surtout la forte diminution de la concentration en aldéhydes et en alcools des essences obtenues par expression à froid. Pour les essences distillées, le décalage par rapport aux essences obtenues par ESSAM est moins accentué.

Le **Tableau 15**, énumère les différents composés groupés rencontrés dans les différentes HEs d'orange obtenues par différentes méthodes d'extraction: les fractions oxygénées et non oxygénées et la composition de familles chimiques. La fraction totale oxygénée dans l'HE obtenue par la méthode d'extraction l'ESSAM (1,6%) est 40% supérieure par rapport à la méthode d'extraction HD (0,82%) et 30% supérieure par rapport à celle de CP (0,95%) **Figure 30**. Les hydrocarbures monoterpéniques sont moins appréciables que les composés oxygénés en termes de contribution au caractère « parfum » de l'HE. À l'inverse, les composés oxygénés sont fortement odoriférants et, par conséquent, les plus recherchés dans le domaine de la cosmétique et de parfumerie.

Les hydrocarbures monoterpéniques (eg. le limonène) sont présents en quantités plus importantes dans l'HE hydro-distillé (95,48%) que l'HE extraite par micro-onde (94,64%), mais l'extrait obtenu par ESSAM est plus concentré en **Monoterpènes Oxygénés** (1,09 vs. 0,55-0,58%). La plus grande proportion de composés oxygénés obtenue dans l'HE extraite par ESSAM est probablement due à la diminution des effets thermiques et hydrolytiques, par rapport au CP qui utilise une grande quantité d'eau et une HD qui consomme du temps et de l'énergie. L'eau est un solvant polaire, qui accélère de nombreuses réactions, en particulier les réactions par carbocation considérées comme des réactions intermédiaires. L'HE des écorces d'orange extraite par ESSAM, CP et HD contient les mêmes composants dominants. Le Linalool est le composant oxygéné principal dans l'HE extrait des écorces d'orange, mais les quantités relatives diffèrent pour les trois méthodes d'extraction. La fraction oxygénée a été plus abondante dans l'HE obtenue par la méthode ESSAM (0,62%), tandis que celle obtenues par HD et CP contiennent 0,3%. Pour le cas de l'extraction par CP, l'HE d'orange obtenue devrait être agitée vigoureusement en présence d'eau résiduelle et, par conséquent, une diminution progressive des composés oxygénés solubles dans l'eau pourrait se produire. Les substances colloïdales accompagnent toujours l'huile libérée de l'écorce d'orange, tendant à promouvoir son émulsification. Par conséquent, la méthode CP donne des rendements d'extraction plus faibles et une teneur plus faible en composés oxygénés, mais elle est considérée comme une référence pour l'extraction des HEs à partir des citrus en raison de l'arôme frais résultant de l'extraction par CP.

Tableau 15 : La composition chimique HE d'orange Valencia late (*Citrus sinensis* L.) obtenus par extraction ; ESSAM, HD et CP à partir des écorces.

N°	Composés ^a	R.I. ^b	R.I. ^c	Valencia late		
				ESSAM	HD	CP
				Percentage (%)		
	Monoterpènes			97.48	98.61	98.32
1	Thujene<Alpha->	920	1036	-	-	-
2	Pinene<Alpha->	926	1023	0.43	0.53	0.51
3	Sabinene	961	1121	0.54	0.49	0.54
4	Pinene<Beta->	974	1109	-	-	-
5	Myrcene<Beta->	988	1165	1.64	1.87	1.82
6	Phellandrene<Alpha->	1001	1177	0.15	0.17	0.36
7	Terpinene<Alpha->	1020	1083	-	-	-
8	Limonene	1030	1206	94.64	95.48	95.06
9	Ocimene<(E)-Beta->	1048	1282	0.02	0.02	0.02
10	Terpinene<Gamma->	1103	1285	0.05	0.03	0.01
11	Terpinolene	1120	1304	0.01	0.02	0.01
	Monoterpènes Oxygénés			1.09	0.58	0.55
12	Linalool	1125	1538	0.62	0.30	0.30
13	Citronellal	1167	1478	0.06	0.03	0.04
14	Terpin-4-ol	1191	1590	0.03	0.06	0.02
15	Terpineol<Alpha->	1203	1677	0.10	0.06	0.05
16	Nerol	1237	1781	0.10	0.03	0.08
17	Neral	1268	1670	0.05	0.03	0.06
18	Geraniol	1271	1828	0.04	0.01	-
19	Geranial	1284	1714	0.09	0.06	0.11
20	Thymol	1288	2107	-	-	-
	Sesquiterpènes			0.06	0.10	0.15
21	Caryophellene<E->	1391	1594	0.02	0.02	0.01
22	Humulene<Alpha->	1450	1657	0.01	0.03	0.03

23	Germacrene D	1477	1696	-	-	-
24	Valencene	1488	1705	0.02	0.05	0.02
25	Bisabolene(Beta-)	1508	1718	-	-	-
26	Sesquiterpènes Oxygénés			0.01	-	0.09
27	Elemol	1540	1381	0.01	-	0.09
28	Caryophellene Alcohol	1560	1398	-	-	-
29	Nootkatone	1799	2250	-	-	-
30	Autres Composés Oxygénés			0.50	0.27	0.31
31	Octanol<N->	1102	1544	0.15	0.05	-
32	Nonanal<N->	1126	1400	0.01	0.01	0.02
33	Decanal	1210	1497	0.31	0.19	0.27
34	Linalyl acetate	1255	1553	-	-	-
35	Citronellyl Acetate	1342	1645	0.02	0.02	0.01
36	Neryl Acetate	1351	1706	0.01	-	0.01
37	Geranyl Acetate	1366	1742	-	-	-
38	Dodecanal	1391	1691	-	-	-
	Temps d'extraction (min)			10	180	60
	Rendements %			0.40	0.40	0.16
	Composés Oxygénés Totaux %			1.60	0.82	0.95
	Composés non Oxygénés Totaux %			97.54	98.71	98.47

^a Composés d'huiles essentielles triés par familles chimiques et pourcentages calculés par GC-FID sur colonne capillaire HP5MSTM non polaire.

^b Indices de rétention calculés sur colonne capillaire HP5MSTM non polaire.

^c Indices de rétention calculés sur la colonne capillaire polaire CarbowaxTM-PEG.

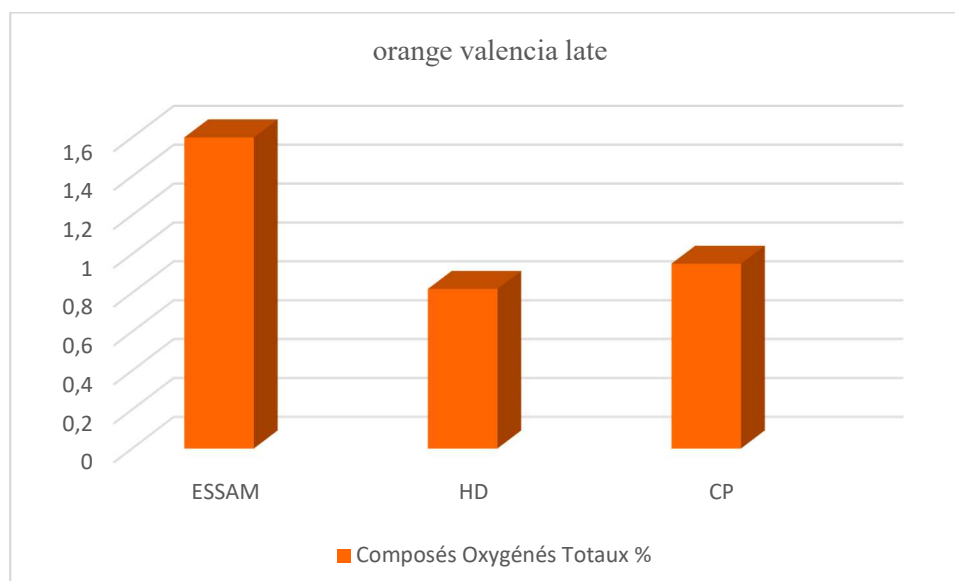


Figure 30 : Proportion de la fraction oxygénée au sein de l'HE du l'orange valencia late après extraction selon trois méthodes.

En évaluant les résultats de la présente étude, les composés identifiés dans les HE d'orange diffèrent à ceux cités dans la littérature scientifique. Ces différences de composition peuvent être attribuables aux conditions écologiques dans les différentes régions. Certes, les facteurs environnementaux, tels que les saisons de récolte, le climat, la localisation géographique, la température, la durée d'ensoleillement et les nutriments, ont été examinés et sont considérés comme des promoteurs potentiels dans la composition chimique des HEs (Caccioni *et al.*, 1998; De Pasquale *et al.*, 2006 ; Hosni *et al.*, 2010,2013 ; Kamal *et al.*, 2011). La production d'espèces végétales, les périodes de récolte et les méthodes d'extraction employées influencent également le chemotype des HEs (Sefidkon *et al.*, 2007 ; Teles *et al.*, 2013; Bagheri *et al.*, 2014). Il est donc possible que les différences génétiques au sein des espèces déterminent l'expression de différentes voies métaboliques indépendamment de leur emplacement géographique.

Les HEs des écorces d'orange extraite par ESSAM, HD et CP sont plutôt similaires dans leur composition. La même quantité de métabolites secondaires volatils se trouve

dans les HEs avec des quantités relatives équivalentes pour les trois méthodes d'extraction. Le Limonène est la composante principale avec 94,64% pour ESSAM, 95,48% pour HD et 95,06% pour CP. Il est clair que les méthodes hyperfréquences accélèrent considérablement le processus d'extraction, mais sans provoquer de changements considérables dans la composition volatile de l'huile, phénomène déjà décrit par **Chemat et al. (2006)**. Presque tous les composants détectés dans les HEs étudiés étaient des hydrocarbures monoterpènes ; représentant 97% dans tous les échantillons. **Bustamante et al. (2016)** a constaté qu'aucune différence remarquable n'a été observée dans la composition des HEs des écorces d'orange extraite par HD et Hydrodistillation assistée par micro-ondes (MAHD). Le D-limonène était le produit chimique le plus abondant dans les HEs extraites (96,75 et 97,38% pour HD et MAHD, respectivement). Les rendements des deux échantillons étaient semblables. En termes de consommation d'énergie, les mêmes auteurs ont constaté qu'une réduction significative a été observée en comparant la HD conventionnelle à l'extraction des micro-ondes (3,2 et 0,5 kWh, respectivement) résultant en un excellent progrès en termes de rentabilité. Un chauffage par micro-ondes provoque un phénomène de surchauffe qui facilite la distension des cellules végétales et conduit à libérer l'HE plus rapidement que dans le cas des méthodes d'extraction classiques **Sahraoui et al. 2011**. **Alparslan et al. (2016)** ont signalé que le sabinène (36,92%) était le composant majeur de l'HE des feuilles d'orange. À l'instar de ce résultat, **Kirbaslar et al. (2012)** ont rapporté que l'huile de feuille d'orange contient 42,85% de sabinène. Le sabinène (40,6%), le linalool (15,2%) et le (E) - β -ocimène (8,9%) ont été déclarés comme les principaux composants de l'huile foliaire de *C. sinensis* cv Valencia d'origine italienne (**Alonzo et al., 2000**).

Cependant, il est intéressant de noter que le limonène qui a été signalé comme composant principal chez les HEs de *C. sinensis* (**Blanco Tirado et al., 1995**) a été détecté aussi dans nos échantillons. **Singh et al. (2010)** ont signalé que le Limonène (90,66%), l'acétate de linalyle (2,8%) et le β -myrcène (1,71%) étaient les composés principaux de l'HE extraite de *C. sinensis* non spécifié. Dans l'huile des feuilles de *C. sinensis* var. mosammi, β -phellandrene (27,54%), δ -carène (7,63%), limonène (4,87%) et β -pinène (3,27%) ont été signalés comme étant des composés majeurs (**Siddique et al., 2012**).

Le Limonène (96,0-97,3%) suivi de β -pinène (1,45-1,82%) ont été les principaux composants de l'HE orange de la Tunisie (**Hosni et al., 2010**). Le contenu élevé du d-limonène dans les huiles d'orange algériennes est en accord avec les différents travaux dans différentes régions du monde (**da Camara et al., 2015; Lopes et al., 2003; Singh et al., 2010**). **Chutia et al. (2009)** qui ont constaté que l'HE extraite des écorces de *C. reticulata* provenant de l'Inde est principalement composée d'acétate de limonène, de géranium, de nerine et de géranyle. Les mêmes composés bioactifs majeurs ont déjà été signalés précédemment dans l'HE des feuilles et des écorces *C. limon* d'origine grec (**Vekiari et al., 2002**). Dans une étude comparative des HEs de citrus de Colombie (citron, mandarine et écorce d'orange), le limonène, γ -terpinène et sabinène ont été signalés (**Blanco Tirado et al., 1995**).

Des études antérieures concernant l'HE de *C. sinensis* de différentes régions du monde ont été axées sur la composition de l'huile de l'écorce d'orange. Par exemple, Limonene (94,95%) et myrcène (1,87%) ont été déclarés comme les principaux composants de la variété italienne (**Caccioni et al., 1998**). **Ferhat et al. (2006)** en ont indiqué que le limonène (78,5%), le myrcène (5,3%) et le β -pinène (2,7%) étaient les composants majeurs de l'huile de l'écorce d'orange d'origine algérienne. Le limonène (94,7%) et le myrcène (2%) ont été déclarés comme composants de base la variété vietnamienne (**Minh Tu et al., 2002**). Dans une étude antérieure, **Scora et Newman (1967)** ont signalé que la teneur en limonène variait de 34,74% à 58,54% dans le même cultivar d'origine de Californie. Les mêmes auteurs ont déclaré un pourcentage relativement élevé de myrcène (13,21-23,54%). Contrairement aux études susmentionnées, nos résultats ont montré une très faible quantité de myrcène (1,64-1,87%).

III.2.3. Constantes physiques

Les huiles essentielles d'orange douce (valencia late) ont été analysées selon la méthode standard NF soit par HD, soit par ESSAM : densité relative, indice de réfraction et le pouvoir rotatoire. Le **Tableau 16** regroupe les résultats propres à la mesure de ces indices physiques.

Tableau 16 : Propriétés physiques de l'huile essentielle d'Orange douce (Valencia late) extraite par HD et par ESSAM.

Constantes physiques	HD	ESSAM
Densité relative à 20 °C	0,840g/l	0,820g/l
Indice de réfraction à 20 °C	1,492	1,490
Pouvoir rotatoire à 20 °C	+95°	+94°

La comparaison de nos résultats a montré clairement que ; il n'y a pas de différence significative entre les constantes physiques des huiles essentielles obtenues par ces méthodes (HD, ESSAM).

III.3. Détermination des phénomènes mis en jeu dans l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes

La synthèse des travaux effectués montre que l'efficacité de l'ESSAM pour l'extraction des huiles essentielles des agrumes par rapport à HD et CP. Nous avons ainsi pu constater qu'il est possible d'extraire autant d'huile essentielle en 10 minutes par ESSAM qu'en 180 minutes par HD. En revanche, pour l'extraction d'huile essentielle par expression à froid, les rendements obtenus en 60 minutes sont nettement inférieurs à ceux obtenus par ESSAM et HD. L'un des avantages de l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes est incontestablement le gain de temps et donc par conséquent l'économie d'énergie.

L'étude qualitative a permis de remarquer des différences significatives dans la composition des huiles essentielles selon leur mode d'extraction. Tout d'abord, L'huile essentielle de zeste des *Citrus* étudiée est dominée par le limonène tandis qu'une importante variabilité a été observée dans la proportion de la fraction oxygénée selon la technique d'extraction utilisée. La fraction oxygénée, composée de molécules hautement valorisables olfactivement est toujours supérieure dans l'huile essentielle obtenues par ESSAM.

Afin de valoriser les données expérimentales obtenues et pour une meilleure explication des phénomènes d'extraction, nous nous sommes intéressés aux facteurs influençant

l'extraction par ESSAM ; Pour cela, nous avons fait la Synthèse et bilan des études antérieures concernant les extractions assistées par micro-ondes (**Mengal et al., 1993 ; Spiro et Chen, 1995 ; Paré et Bélanger, 1997 ; Lucchesi et al., 2004(a,b) ; Lucchesi., 2005 ; Ferhat et al ., 2007 Golmakani et Rezaei, 2008(a,b); Bousbia et al., 2009 ; Farhat et al., 2011 ; Golmakani et Moayyedi, 2015**).

Enfin, Nous avons essayé de comprendre les différences rencontrées dans la composition des huiles essentielles extraites par ESSAM, CP et HD

A/ Effet sur la morphologie des cellules sécrétrices des écorces d'agrumes

Afin d'observer le comportement des cellules sécrétrices de l'écorce de Valencia late, les études par microscopie électronique à balayage soumises aux deux types d'extraction ESSAM et HD. Ont permis d'observer l'état des cellules avant et après l'extraction. Ils montrent des parois cellulaires endommagées en raison de l'explosion produite au niveau de la paroi cellulaire, conséquence de l'augmentation soudaine de la température. Ces dommages sont générés par des points chauds produits à l'interface des parois lors de l'irradiation par micro-ondes. En effet, quand les glandes sont sujettes à un stress thermique très sévère et à de hautes pressions localisées induites par un chauffage spécifique de type micro-ondes, la pression interne dans les glandes peut excéder leur capacité d'expansion extrême.

De plus, la présence de composés polaires tels que l'eau et les composés oxygénés, peut provoquer une augmentation soudaine de la température favorisant un processus de déshydratation localisé avec une vitesse de chauffe très élevée à l'intérieur de la cellule. Ce dernier phénomène augmente la vitesse de transfert des constituants de la cellule à travers les parois cellulaires.

Le mécanisme d'extraction propose la présence de deux mécanismes d'extraction distincts. : Le premier, faisant intervenir la diffusion de l'huile essentielle à travers la paroi glandulaire, peut survenir dans toutes les procédures. Le second est traduit par l'exsudation rapide de l'huile dans le milieu, suivie de la rupture des parois glandulaires attribuée probablement à une implosion causée soit par le processus de déshydratation soit par une explosion survenue au niveau des parois cellulaires sujettes à un stress thermique très sévère.

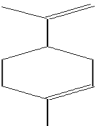
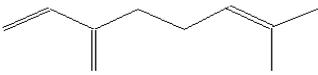
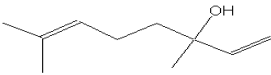
B/ Effet de la température

Dans le but de mieux comprendre la rapidité de l'extraction par ESSAM en comparaison à celle de HD et pourquoi obtient-on plus de composés oxygénés par ESSAM alors que la distillation est plus rapide et que ces produits ont une température d'ébullition plus élevée ? Et pourquoi on obtient moins de limonène (175°C) par ESSAM alors qu'on distille plus rapidement et que la température d'ébullition de cet hydrocarbure est plus basse que celle des autres composés oxygénés (220-250°C) ? Les études nous permettront de tirer au clair ces constatations.

Dans l'exemple de la variété d'orange douce étudié **Tableau 17** le limonène, le β -myrcène, le linalol, et le géraniol, sont les composés majoritaires de l'huile essentielle valencia late quelle que soit la technique d'extraction utilisée. Plus, ces composés sont ceux qui possèdent le point d'ébullition le plus faible, du fait en partie de leur structure simple et plus légère. Quel que soit le mode d'extraction, le limonène est largement prépondérant.

L'huile essentielle de valencia late est cependant nettement dominée par le limonène dont la température d'ébullition est de 175°C quelle que soit la technique d'extraction utilisée.

Tableau 17 : Composés majoritaires dans les huiles essentielles de Valencia late

Huile essentielle	Composés majoritaires	Structure	Teb (°C)	ESSAM (%)	HD (%)
Valencia late	Limonène		175	94,64	95,48
	β -myrcène		167	1,64	1,87
	linalol		220	0,62	0,3

L'autre composé majoritaire de cette huile est le β -myrcène, composé non oxygéné certes, mais dont le point d'ébullition (167°C) est nettement plus faible que celui de linalol (220°C), composé oxygéné présent en faible quantité au sein de cette huile essentielle.

De manière générale, l'ESSAM permet une meilleure extraction des composés oxygénés par rapport aux composés aromatiques non oxygénés, bien que leur température d'ébullition soit plus élevée. L'ESSAM se déroule en 10 minutes alors que l'HD nécessite au minimum 3 heures. Compte tenu de ces temps, nous pouvons imaginer que les composés oxygénés, à point d'ébullition généralement élevé (Ex :Teb linalol = 220°C) n'auront pas le temps d'être totalement distillés à partir du système rapide d'extraction sans solvant assistée par micro-onde. La majorité des composés extraits sont supposés être de nature non oxygénée avec des températures d'ébullition plus basses (Ex :Teb limonène = 175°C).

Les micro-ondes permettent de libérer plus rapidement l'HE contenue dans la matrice végétale grâce à l'ouverture quasi instantanée des glandes sécrétrices. Lors d'une ESSAM ou d'une HD, la quantité de molécules aromatiques oxygénées ou non est nettement inférieure à la quantité d'eau présente dans la matrice végétale. La température d'ébullition du mélange eau + composés aromatiques est donc imposée par la température d'ébullition de l'eau c'est-à-dire 100°C et ne dépend en aucun cas de la température d'ébullition des composés de l'huile essentielle.

L'explication de la différence de composition chimique entre les procédés d'extraction par HD et ESSAM ne peut être supportée uniquement par les températures d'ébullition des composés oxygénés ou non oxygénés extraits.

Les températures d'ébullition des composés ont été évaluées par le logiciel de calcul spécifique « ACD boiling point » **PhysChem, 2004**.

C/ Effet de la solubilité

Le point d'ébullition d'un composé organique n'explique pas à lui seul le phénomène de distillation, et qu'il faut introduire la notion de solubilité dans une étude du carvi *oedam et al. (1982)*.

La carvone étant soluble dans l'eau, contrairement au limonène, dès lors que l'on commence à chauffer le milieu réactionnel, elle se solubilise et est entraînée par les premières vapeurs d'eau. Une fois le milieu épuisé en carvone, et plus généralement en molécules solubles dans l'eau, le limonène et les autres terpènes commencent alors à être entraînés par la vapeur d'eau. La durée d'une HD étant importante, chaque molécule a le temps d'être distillée quasi totalement. Du fait de la courte durée d'extraction par ESSAM, le phénomène d'extraction s'appuiera plus sur la solubilité que sur la température d'ébullition. Bien que la carvone ait un point d'ébullition très élevé, ce produit est distillé en priorité en raison de sa solubilité élevée dans l'eau. Pour le limonène, son insolubilité dans l'eau est un obstacle à l'entraînement de ce produit bien que son point d'ébullition soit plus bas.

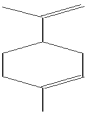
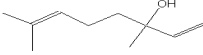
Cependant, **Koedam (1982)**, en reprenant les théories méconnues de **Von Rechenberg** publiées en 1910 explique Le phénomène de vaporisation serait ainsi guidé non pas par la température d'ébullition des composés mais par leur solubilité, c'est ce que nomme Von Rechenberg « le phénomène d'hydrodiffusion ». Pratiquement lors de la mise en œuvre d'une ESSAM, nous ne rajoutons en aucun cas de l'eau à la matière végétale ; seule l'eau interne de la plante (au maximum 95% en masse de la matière végétale pour les plantes fraîches) va entrer en jeu. Alors que pour l'HD, pour traiter 250 g de matière végétale 1 litre d'eau environ a été rajouté au milieu. Les composés aromatiques qui constituent l'huile essentielle sont contenus dans l'écorce qui se trouve directement dans le cas de l'HD ou indirectement dans le cas de l'ESSAM dans un milieu aqueux. Ces composés aromatiques, une fois libérés de la matrice vont ensuite être solubilisés dans le but de former un mélange eau- composés aromatiques qui va être vaporisé, condensé et séparé.

Le **Tableau 18** regroupe la structure, la solubilité dans l'eau, la température d'ébullition et les teneurs des deux principales molécules majoritaires (oxygénée et non oxygénée) de l'huile essentielle de l'orange Valencia late extraite par ESSAM et par HD. Les solubilités des composés ont été évaluées théoriquement en utilisant un logiciel quantique de calcul spécifique.

La solubilité de certains composés, en particulier les composés oxygénés, est beaucoup plus élevée. le linalol possède une solubilité de 0,57g par litre d'eau, celle du limonène est voisine de zéro. Ainsi la difficulté de certaines molécules à se solubiliser

va donc entraîner une certaine sélectivité. Il semblerait donc que cette eau disponible plus faible en ESSAM favorise surtout l'entraînement des molécules les plus solubles, alors qu'en HD la quantité d'eau plus importante permet à chaque type de molécules de distiller de façon plus équitable.

Tableau 18 : Caractéristiques des composés majoritaires de l'huile essentielle d'orange douce Valencia late extraite par ESSAM et HD.

Composés majoritaires	Solubilité dans l'eau (g/l)	T eb. (°C)	ESSAM (%)	HD (%)
Limonène 	0,00042	175	94,64	95,48
Linalol 	0,57	220	0,62	0,30

D/ Effet de la polarité des molécules

Selon **Anizon *et al.*, 2003** La rapidité du chauffage à four à micro-ondes entraîne au niveau moléculaire, les matériaux se présentent comme des entités globalement neutres d'un point de vue électrique mais avec une répartition dissymétrique de leurs charges ioniques partielles. Autrement dit, une partie de la molécule est chargée positivement, l'autre partie négativement. Ces molécules forment donc des dipôles électriques.

Le mécanisme du chauffage diélectrique repose sur le fait que les molécules polaires, telles que l'eau, ont des extrémités négatives et positives : ce sont des dipôles. En l'absence de champ électrique, les dipôles d'un milieu diélectrique se trouvent orientés au hasard sous l'effet de l'agitation thermique du milieu. Sous l'effet d'un champ électrique continu, les molécules tendent à s'orienter dans la direction du champ électrique. Plus le champ électrique est intense, moins l'agitation thermique qui tend à désorganiser l'alignement a de l'importance. Lorsque toutes les molécules sont orientées, un moment dipolaire global induit apparaît. Sous l'effet d'un champ électrique

alternatif de fréquence f , les dipôles s'orientent dans la direction du champ sur une demi alternance, se désorientent lorsque le champ s'annule et se réorientent dans l'autre sens pendant la seconde demi alternance : c'est la rotation dipolaire. L'énergie électrique est convertie en énergie cinétique par la rotation des dipôles. L'énergie cinétique est transformée partiellement en chaleur : l'alignement des dipôles par rapport au champ électrique est contrarié par les forces d'interactions entre molécules (les forces de liaison par pont hydrogène et les forces de liaisons de Van der Waals) A 2450MHz, le champ oscille $4,9 \times 10^9$ fois par seconde, ce qui contraint l'agitation des molécules et donc génère de la chaleur.

Ces forces peuvent être assimilées à des forces de frottement interne qui existent dans les contacts solide-solide. Elles s'opposent ainsi à la libre rotation des molécules. De la friction produite, naît le dégagement de chaleur comme le montre la **Figure 31**.

La dissipation d'énergie par le produit peut être maximale si la fréquence du champ électrique est égale à la fréquence de relaxation. Le phénomène de relaxation correspond à l'apparition d'un déphasage entre l'oscillation du champ électrique et celui des dipôles. Les fréquences micro-ondes étant imposées, l'échauffement d'un produit avec une efficacité maximale est exceptionnel. Dans ce cas, une grande partie des molécules soumises à l'action du champ micro-ondes ne tournent pas avec le changement alternatif du champ mais frissonnent.

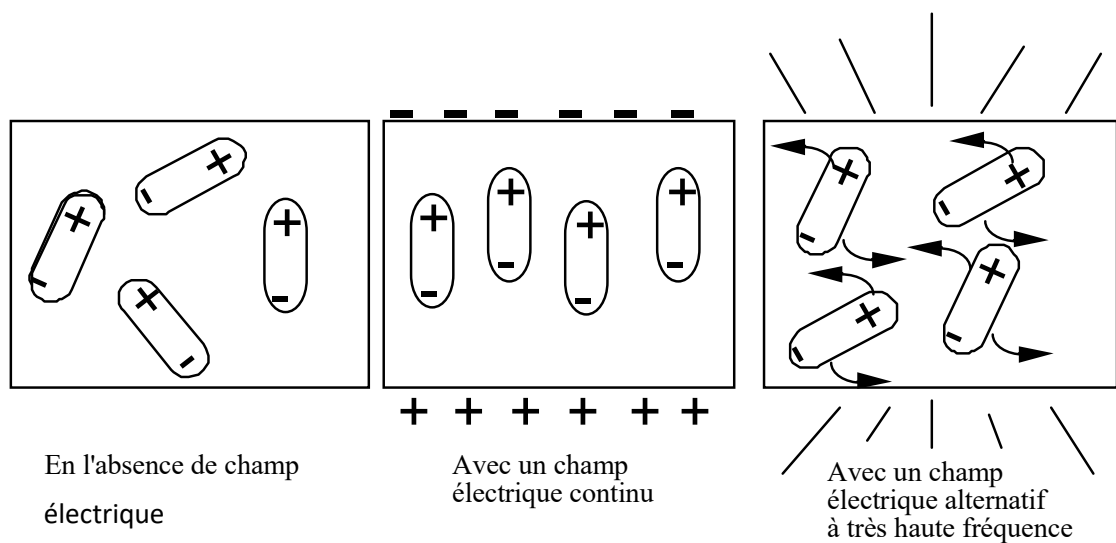


Figure 31 : Rotation des dipôles soumis à une irradiation micro-onde.

L'aptitude d'un matériau à s'échauffer sous l'action d'un rayonnement micro-ondes est qualifiée par le facteur de pertes diélectriques ϵ'' . Les produits ayant un facteur de pertes supérieur à 1 s'échauffent facilement par micro-ondes. Parmi ces composés à pertes diélectriques élevées, on peut citer l'eau à l'état liquide, les produits naturels riches en eau, des solvants polaires comme les alcools. En pratique, le principal paramètre pour estimer si un produit naturel peut être chauffé par micro-ondes est sa teneur en eau. Quand celle-ci est supérieure à 20% en masse, le produit va s'échauffer facilement sous l'effet des micro-ondes. Le facteur de pertes ϵ'' représente le comportement global du matériau soumis au rayonnement micro-ondes. Il peut être décomposé en deux phénomènes, la polarisation et la friction. La permittivité relative ϵ' , ou constante diélectrique, traduit la faculté du diélectrique à se polariser, autrement dit à s'orienter dans le sens du champ électrique. La friction se manifeste par le léger retard pris par les matériaux polarisés pour s'orienter après l'application du champ électrique. Ce déphasage est représenté par l'angle de pertes δ (Anizon *et al.*, 2003). Le facteur de pertes diélectriques ϵ'' est égal à la constante diélectrique multipliée par la tangente de l'angle de pertes $\epsilon'' = \epsilon' \tan \delta$.

Les HEs sont composées de molécules aromatiques présentant une très grande diversité de structure et qui peuvent être divisées en deux groupes principaux : les hydrocarbures terpéniques et les composés oxygénés. Dans le cas de l'huile essentielle de la variété Valencia late issue de l'ESSAM où le linalol et le limonène sont justement les composés majoritaires, nous observons une plus grande teneur en composés oxygénés principalement le linalol : (moment dipolaire égal à 22, constante diélectrique égal à 2,11) par rapport aux hydrocarbures terpéniques principalement le limonène (moment dipolaire égal à 14, constante diélectrique égal à 0,75). Le moment dipolaire, la constante diélectrique (Ces propriétés diélectriques ont été calculées grâce au logiciel de chimie quantique **Hyperchem**).

E/ Mécanismes proposés

La synthèse et bilan des études concernant les extractions assistées par micro-ondes sur l'effet des micro-ondes sur la morphologie, sur la modélisation de la cinétique d'extraction, alliée à celle de facteurs intrinsèques à la molécule cible comme la température d'ébullition, la solubilité ou la polarité et les constantes diélectriques, a permis de faire ressortir deux mécanismes possibles spécifiques à l'ESSAM.

- Mécanisme I : pour un échantillon à pertes diélectriques élevées (teneur en eau supérieure à 20%) l'extraction peut être assurée par les micro-ondes sans ajout d'eau ou de solvant organique. La présence de composés polaires tels que l'eau et les composés oxygénés, peut provoquer une augmentation soudaine de la température favorisant un processus de déshydratation localisé avec une vitesse de chauffage très élevée à l'intérieur de la cellule. Ce dernier phénomène augmente la vitesse de transfert des constituants de la cellule à travers les parois cellulaires. Du fait de la courte durée d'extraction par ESSAM ce mécanisme semble être régi prioritairement par des phénomènes de solubilité : le non rajout d'eau au sein du réacteur va favoriser la sélectivité au niveau de l'entraînement des molécules les plus solubles qui sont en outre les molécules constituant la fraction oxygénée, d'une plus grande valeur ajoutée sur le plan olfactif.
- Mécanisme II : Le mécanisme du chauffage diélectrique repose sur le moment dipolaire des huiles essentielles. Les composés avec des moments dipolaires élevés s'échauffent facilement par micro-ondes et sont extraits avec des proportions élevées par rapport aux composés aromatiques ayant des moments dipolaires faibles.

III.4. Analyse statistique

L'analyse des données résultant du plan d'expérience de type « composite centré », réalisé en 18 expériences, dans lequel trois paramètres (temps d'extraction, masse de matière et puissance) ont été testés. Le logiciel *STATGRAPHICS* a été utilisé afin de déceler l'influence de chaque paramètre sur le rendement d'extraction.

III.4.1. Réalisation des essais et résultats obtenus

Les essais ont été réalisés conformément à la matrice du plan d'expérience (**Tableau 19**) et selon l'ordre aléatoire donné par le logiciel. Nous rappelons que ces résultats ne sont valables que dans le domaine de variation des facteurs considérés.

Tableau 19 : Expériences réalisées dans le plan expérimental et rendements obtenus

Essai	Puissance	Temps	Masse	Rendement
1	-1	-1	-1	0,094
2	+1	-1	-1	<u>0,137</u>
3	0	0	-1	0,099
4	-1	+1	-1	0,127
5	+1	+1	-1	0,129
6	0	-1	0	0,066
7	-1	0	0	0,086
8	0	0	0	0,104
9	0	0	0	0,104
10	0	0	0	0,104
11	0	0	0	0,104
12	+1	0	0	0,112
13	0	+1	0	0,111
14	-1	-1	+1	<u>0,041</u>
15	+1	-1	+1	0,067
16	0	0	+1	0,084
17	-1	+1	+1	0,056
18	+1	+1	+1	0,108

L'analyse des résultats du **Tableau 19** révèle que les réponses (rendements) obtenues de 0,041 à 0,137 % varient en fonction du niveau d'implication de chaque facteur dans l'expérience.

Le rendement optimal obtenu par la méthode expérimentale est de l'ordre de 0,137 %, relatif à l'expérience 2, ayant comme coordonnées réduites (+1,-1,-1). Ceci correspond à une puissance de **600 W**, un temps de chauffage de **15 min** et une masse de **75 g**.

III.4.2. Analyse de variance

Une analyse de la variance (ANOVA) a permis de tester la pertinence des variables impliquées dans le modèle étudié et de représenter graphiquement l'importance de chaque facteur sur la réponse étudiée. Dans ce type d'analyse, nous pouvons déterminer la signification ou non des facteurs du modèle à l'aide de l'hypothèse nulle, notée H_0 , qui suppose que l'effet du paramètre est nul. La probabilité d'accepter cette hypothèse est notée Val-p.

- Si Val-p < 5 %, H_0 est rejetée et le paramètre sera significatif.
- Si Val-p > 5 %, H_0 est retenue et le paramètre sera non significatif.
-

Le **Tableau 20** représente les résultats de l'analyse de la variance. On remarque que les trois facteurs sont significatifs. Dans ce sens, un diagramme dit de *Pareto* illustre la pertinence des variables impliquées ainsi que les effets quadratiques (ensemble de paires de paramètres), (**Figure 32**).

Tableau 20 : Données obtenues à partir de l'analyse de la variance du modèle statistique

Paramètre	Val-p
C : masse	<u>0,0009</u>
A : puissance	<u>0,0103</u>
B : temps	<u>0,0224</u>
AC	0,4225
BC	0,4492
BB	0,4765
AA	0,6519
CC	0,6999
AB	0,7012

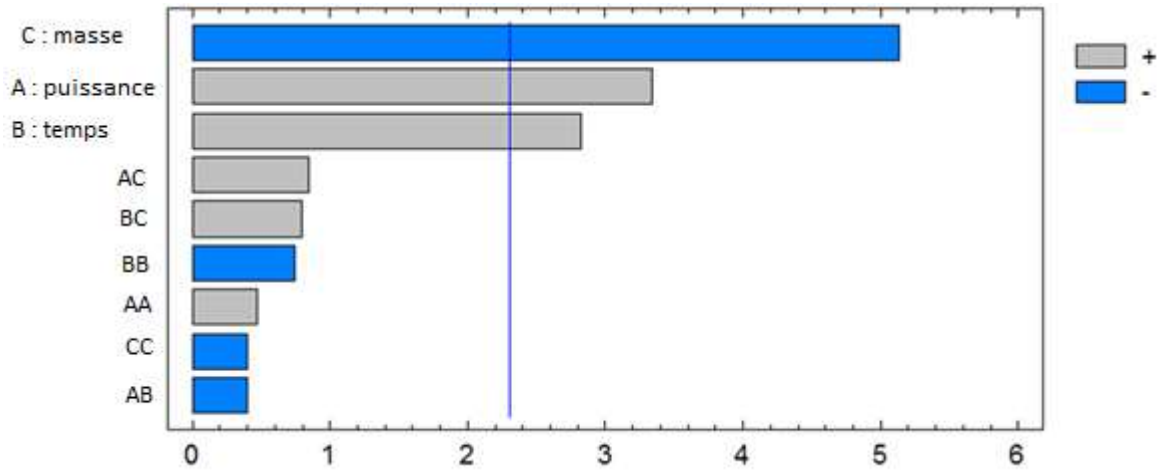


Figure 32 : Diagramme de Pareto présentant l'influence standardisée de chaque effet.

AA : Effets quadratique de la puissance.

BB : Effets quadratique du temps d'extraction.

CC : Effets quadratique de la masse d'extraction.

AC : interaction entre facteur puissance et masse d'extraction.

BC : interaction entre facteur temps d'extraction et masse d'extraction.

AB : interaction entre facteur puissance et temps d'extraction.

Nous pouvons remarquer que pour chaque variable les effets (linéaires, quadratiques, interactions entre facteurs) contribuent à la réponse et sont classés selon leur ordre décroissant d'importance. La longueur des barres sur ce graphique est proportionnelle à la valeur absolue de l'amplitude des effets estimés des facteurs. La barre transversale représente l'amplitude minimale à partir de laquelle les effets seront considérés comme étant statistiquement significatifs sur la réponse étudiée. Nous observons aussi sur ce diagramme que le paramètre le plus influant est représenté par la masse de l'échantillon (C). Par contre, la puissance micro-ondes appliquée (A) et le temps d'extraction (B) révèlent une importance moins significative mais remarquable. D'autre part, il est important de noter l'absence d'effets significatifs des produits croisés (interactions entre variables : AB, BC, AB). Ceci révèle une absence totale d'interactions entre les variables dans le domaine expérimental étudié.

III.4.3. Les effets simples

Les effets simples des paramètres représentent la variation d'un paramètre de son niveau inférieur à son niveau supérieur, lorsque les autres paramètres sont à leurs niveaux centraux. Les effets simples des trois facteurs sur le rendement sont représentés par la **Figure 33**.

L'examen de la **Figure 33** montre des effets simples, similaires de la puissance et du temps d'extraction sur le rendement d'extraction. Ce dernier varie proportionnellement avec ces deux paramètres opératoires. Par contre, l'effet simple de la masse est nettement différent. En effet, le rendement d'extraction augmente pour de faibles teneurs en masse, passe par un maximum puis diminue. L'analyse de la variance des paramètres a montré que l'effet de ce facteur était significatif.

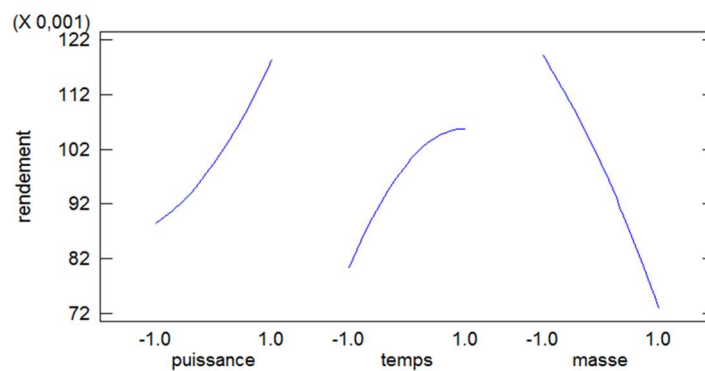


Figure 33 : Effets simples des paramètres.

III.4.4. Détermination du modèle

L'extraction de l'huile essentielle par ESSAM peut être représentée sous la forme d'une équation polynomiale du second degré, donnée ci-dessous, dont les effets estimés de chaque coefficient sont représentés au **Tableau 21**.

$$R_{HE}(\%) = 0,00994762 + 0,015p + 0,0127t - 0,0231m + 0,00404762p^2 - 0,002pt + 0,00425pm - 0,00645238t^2 + 0,004tm - 0,00345238m^2$$

Le modèle mathématique de la réponse est utilisé par le logiciel pour calculer les réponses dans tout le domaine d'étude, en négligeant les effets non significatifs.

Le modèle mathématique se réduit donc à :

$$R_{HE} (\%) = 0,00994762 + 0,015p + 0,0127t - 0,0231m$$

Tableau 21 : Coefficients du modèle

Paramètres	Valeurs réelles des coefficients
Constante	0 ,00994762
A : p	0,015
B : t	0,0127
C : m	- 0,0231
AA	0 ,00404762
AB	- 0,002
AC	+0,00425
BB	- 0,00645238
BC	0,004
CC	- 0,00345238

Le modèle développé présente un coefficient de régression R^2 égale à **85,74** , cela signifie qu'il est approprié mais nécessite une amélioration dans la prise en charge d'autres paramètres pouvant influencer l'extraction.

L'ajustement du modèle peut être vérifié en comparant les valeurs expérimentales obtenues pour le rendement en HE et celles prédites par le modèle (**Tableau 22**). Plus les valeurs sont proches, plus l'ajustement du modèle est satisfaisant et, par conséquence, le modèle décrit bien le comportement du système étudié. Dans ce cas, nous pouvons remarquer que les valeurs des rendements obtenue expérimentalement et ceux estimés par le modèle sont proches.

Tableau 22 : Valeurs expérimentales et calculées du rendement en huile essentielle.

Essais	Valeurs Rdt _{HE} expérimentales(%)	Valeurs Rdt _{HE} calculés (%)
1	0,094	0,0869881
2	0,137	0,1290381
3	0,099	0,1190476
4	0,127	0,1249381
5	0,129	0,1259881
6	0,066	0,0804476
7	0,086	0,0886476
8	0,104	0,0994523
9	0,104	0,0994523
10	0,104	0,0994523
11	0,104	0,0994523
12	0,112	0,1184476
13	0,111	0,1056476
14	0,041	0,0417381
15	0,067	0,0667881
16	0,084	0,0730476
17	0,056	0,0616881
18	0,108	0,1127381

La **Figure 34** est déduite par le logiciel STATGRAHPICS, où nous avons les points expérimentaux exprimant les rendements et la droite de prédiction. Nous remarquons que les points expérimentaux sont proches du modèle proposé.

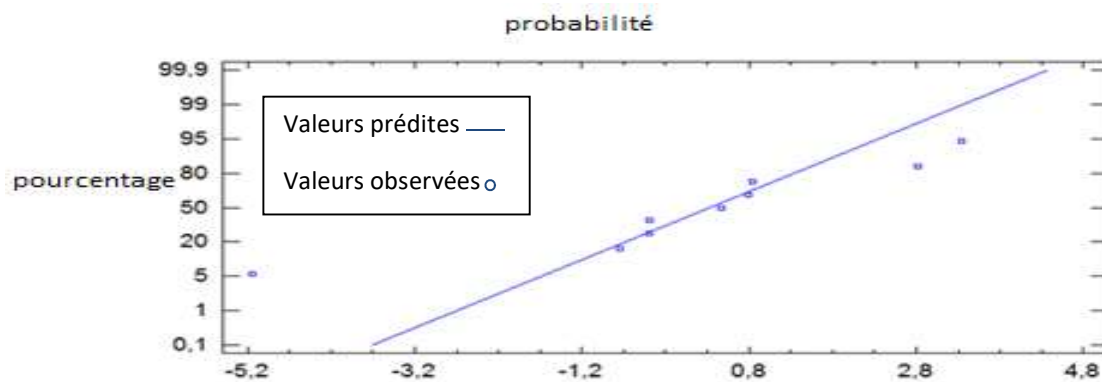


Figure 34 : Valeurs Observées en fonction des valeurs prédites.

III.3.5. Optimisation des résultats

La valeur optimale du rendement délivrée par le logiciel TATGRAPHICS est de l'ordre de 0,136 %, comparable à 0,137 %, obtenue expérimentalement (**Tableau 23**).

Tableau 23 : Conditions optimales du rendement.

Variables	Puissance (W)	Temps (min)	Masse (g)
En valeurs codées	1	0,5203	- 1
En valeurs réelles	600 w	22,6015 min	75

III.4.6. Surface de réponse

Dans cette partie, la **Figure 35** illustre les surfaces de réponses et la projection en deux dimensions des effets combinés tout en gardant le troisième paramètre constant au niveau central. Pour la combinaison (puissance, temps de chauffage), une légère courbure est observée suggérant une réponse maximale avec les niveaux hauts des deux variables. En ce qui concerne la combinaison (puissance, masse), le rendement en HE sera maximal lorsque les deux facteurs sont à leurs niveaux hauts ; enfin la combinaison (temps, masse) montre que le rendement prend sa valeur maximale lorsque les deux facteurs prennent des valeurs intermédiaires.

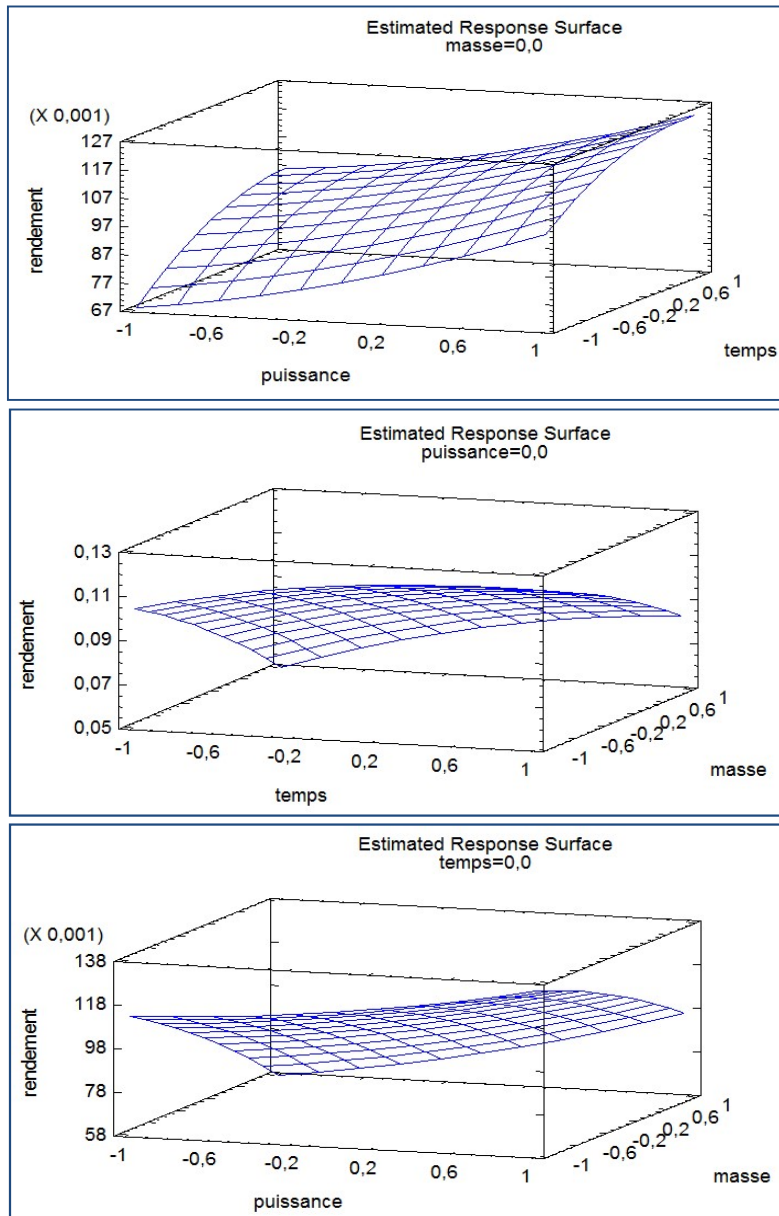


Figure 35 : Surfaces de réponses traduisant les effets combinés des paramètres sur le rendement en HE.

III.4.7. Effet conjugué des paramètres sur le rendement

La présentation des effets d'interaction permet d'illustrer l'influence d'un facteur sur un autre, lorsque ce dernier est à son niveau bas, puis à son niveau haut, le troisième étant à son niveau zéro. Graphiquement, ces effets sont définis comme significatifs lorsque les courbes représentées ne varient pas dans le même sens à leurs niveaux inférieur et supérieur. La **Figure 36** donne la représentation graphique de ces effets.

L'examen de cette figure montre que les trois couples de courbe varient dans le même sens de leur niveau bas à leur niveau haut. Pour cela, leurs effets sont jugés comme non significatifs.

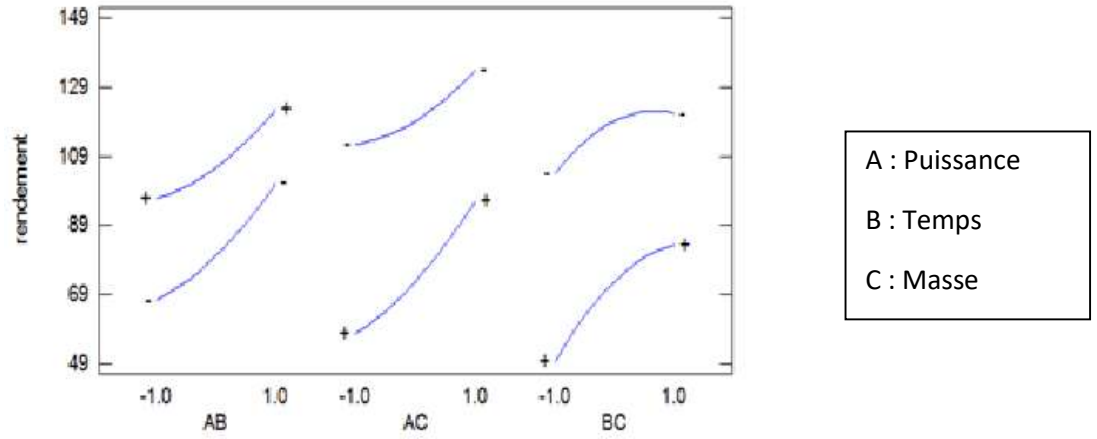


Figure 36 : Effets d'interaction des paramètres opératoires sur le rendement.

III.5. Activité antioxydante de l'huile essentielle d'orange douce Valencia Late

L'HE d'orange extraite par ESSAM a été utilisée pour cette partie

III.5.1. Test anti-radicalaire (DPPH•)

Ces derniers temps, un intérêt croissant a été enregistré pour les antioxydants naturels qui peuvent jouer un rôle important dans la prévention de diverses oxydations chimiques de divers aliments. L'activité antioxydante de l'HE d'orange que nous avons étudiée a été évaluée en utilisant le test du radical DPPH•.

La **Figure 37** montre, le pourcentage d'inhibition du radical DPPH• pour les différentes concentrations utilisées d'HE, Il ressort de cette figure que l'activité anti-radicalaire de l'HE d'orange est proportionnelle à la concentration utilisée, Le pourcentage d'inhibition variait de 21 à 81% selon les concentrations testées (**Figure 37**).

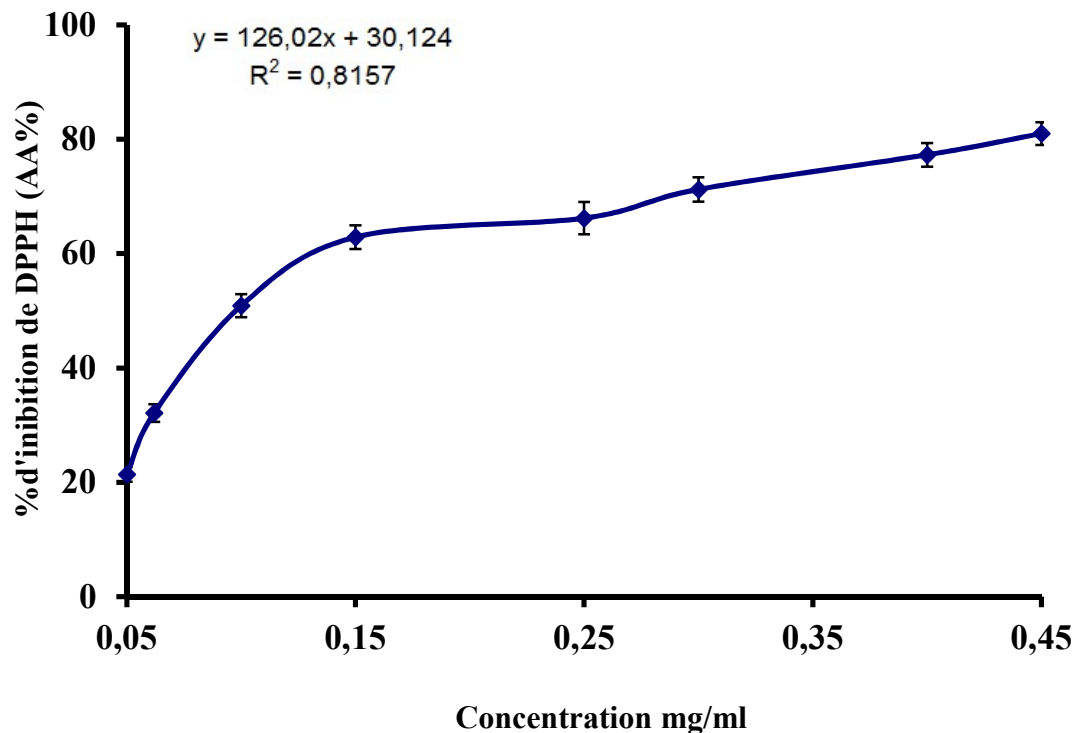


Figure 37: % d'inhibition de DPPH (AA) des différentes concentrations de l'HE d'orange valencia late.

L'HE *C.sinensis* a montré une forte activité antiradicalaire, La plus faible valeur IC_{50} (activité antioxydante la plus élevée) de 89,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a été obtenue pour cette HE (**Tableau 24**), huit (8) fois plus grande ($p < 0,05$) que la valeur attribuée au composé de référence BHT utilisé comme témoin positif ($IC_{50} = 11,37 \mu\text{g}/\text{ml}$).

Selon les catégories définies par **Scherer et Godoy (2009)**, l'HE *C. sinensis* testée dans la présente étude a montré une forte activité antioxydante (AAI =1,12 $\mu\text{g}/\text{ml}$). A notre connaissance, aucun travail n'a été réalisé sur l'activité antioxydante d'HE d'orange en utilisant la méthode DPPH, cependant quelques études ont été menées pour étudier son potentiel antioxydant en utilisant d'autres méthodes d'essais ou en utilisant d'autres espèces d'agrumes, L'aptitude de l'HE d'orange à éliminer les radicaux libres pourrait être attribuée aux constituants phénoliques car les monoterpènes sont responsables de la réactivité globale de l'huile d'orange par rapport au radical DPPH.

Nos résultats sont semblables à ceux rapportés antérieurement par **Singh et al, (2010)** qui ont examiné l'activité antioxydante de l'HE d'orange en utilisant la méthode DPPH, L'activité antioxydante des HEs d'orange a également été signalée par d'autres chercheurs, Dans divers travaux scientifiques, les auteurs ont discuté de la relation entre les capacités antiradicalaire de l'extrait végétal et le contenu total en composés phénoliques, La relation entre l'activité antioxydante et leurs profils chimiques a été déjà rapportée,

Généralement, les activités antioxydantes des HEs des plantes ont été attribuées à leurs principaux composés majeurs, Ainsi, l'intensité de l'activité antioxydante pour l'espèce étudiée peut être liée principalement aux composants principaux qui sont le limonène (94,64-95,48%) et le β -myrcène (1,64-1,87%). Même les autres composés mineurs présents pourraient expliquer dans une partie les activités antioxydantes élevées pour cette espèce ; il est difficile d'attribuer l'effet antioxydant de l'HE entier à un ou à quelques composés actifs, Les composés mineurs et majeurs devraient jouer un rôle important dans l'activité de l'HE, étant donné que le limonène est le principal composé d'HE d'orange étudiée dans ce travail. Nos résultats confirment l'étude de **Bacanh et al, (2015)** et **Fancello et al, (2016)** qui ont décrit l'activité antioxydante de ce composé majeur. Dans le même ordre d'idées, **Junior et al, (2009)**; **Singh et al, (2010)** ont constaté que la nature antioxydante des HEs en termes de piégeage de radicaux libres peut également être due au DL-limonène principalement présent dans

l'HE des citrus, Les antioxydants synthétiques comme l'hydroxyanisole butylé (BHA) et l'hydroxytoluène butylé (BHT) ont été efficacement utilisés pour freiner l'oxydation des lipides dans les produits d'origine animale, Pour des raisons de risque que ces substances de synthèse peuvent engendrer sur la santé du consommateur, ces dernières années les recherches ont été orientées vers des substances naturelles.

Tableau 24 : Propriétés antioxydantes de l'HE d'orange valencia late, Test DPPH.

Méthode	Paramètres	HE orange (<i>Citrus sinensis</i> L)
Test DPPH	- IC ₅₀ (µg/ml)* - Indice d'activité antioxydante (AAI)** -Activité antioxydante	89,25 ± 3,45 1,12 ± 0,08 Forte

*IC₅₀ (µg/ml) de BHT = 11,37 ± 0,35

**AAI < 0,5 (faible) ; 0,5 < AAI < 1,0 (moyenne) ; 1,0 < AAI < 2,0 (forte) et AAI > 2,0 (très forte),

- IC₅₀, La concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH• initiale de 50%.

III.5.2. Application dans les ovoproduits liquide

III.5.2.1. pH et teneur en matières grasses d'OEL

Dans les ovoproduits (OEL), habituellement obtenus à partir de le cassage et de l'homogénéisation ultérieure des constituants des œufs, le pH est un attribut essentiel pour l'obtention de certaines propriétés fonctionnelles liées au produit. Le pH, les solides totaux et les matières grasses sont les principaux indices de qualité corrélés aux propriétés fonctionnelles et à la stabilité pendant le stockage et les différents traitements.

Les OEL sont utilisés par l'industrie alimentaire comme ingrédients alimentaires en raison de leurs excellentes propriétés fonctionnelles (**Chang et Chen, 2000 ; de Souza et Fernandez, 2011**).

Nos résultats ont montré que les échantillons non traités (témoins) et ceux traités ont une valeur de pH moyenne de 7,56 et 7,68 respectivement, Les valeurs de pH entre les échantillons de l'OEL n'étaient pas significativement différentes ($p > 0,05$) pendant le stockage réfrigéré (Résultats non affichés), nos résultats sont en accord avec **Monfort**

et al., (2012) et Rossi *et al.*, (2010) qui ont déclaré des valeurs moyennes de 7,64 et 7,5 respectivement.

L'analyse de la matière grasse de l'OEL (Albumine 67%, Jaune 33%) a montré une valeur de 9,98% (p/p) (Tableau 25). Le résultat observé est similaire aux travaux de Jin *et al.* (2015) et Ragni *et al.*(2011) qui ont déclaré 9,88 et 10,09%, respectivement. Les mêmes auteurs ont observé que la teneur en graisse augmente à mesure que la proportion de jaune augmente, car il y a plus de lipides dans le jaune que dans l'albumine. Néanmoins, il est bien connu qu'il existe divers facteurs influençant la composition de l'œuf de poule (Altuntas et Aydin, 2014 ; Hammershøj et Johansen, 2016).

Tableau 25 : Teneur des matières grasse*des OEL.

Produits d'œufs liquides	Composition (p/p %)		
	Jaune (%)	Albumine (%)	Teneur en matières grasses
Blanc	0	100	0,05 ± 0,01 ^a
OEL¹	33,25	66,75	9,98 ± 0,53 ^b
Jaune	100	0	31,42 ± 0,46 ^c

*Les valeurs moyennes dans la même colonne, issues de différentes lettres sont significativement différentes à la probabilité $p < 0,05$.

¹OEL: œuf entier liquide.

III.5.2.2. L'oxydation des lipides (Test SR-TBA)

Les HEs sont qualifiées d'antioxydants naturels en raison de leur capacité à réduire la formation de radicaux libres et de les éliminer, ce qui entraîne une diminution de l'oxydation des lipides dans les aliments, Elles ont été proposées comme substituts potentiels pour les conservateurs synthétiques dans la matrice alimentaire (Djenane *et al.*, 2011b). L'oxydation des lipides conduit à la perte d'acides gras essentiels et à la production de composés à odeur désagréable (composés carbonylés), La prévention de

l'oxydation peut s'effectuer par l'ajout de composés naturels ou de synthèse (**Kansci et al., 1994**).

Un grand nombre de composés sont générés à partir de l'oxydation des lipides qui affectent négativement la qualité, ce qui limite la durée de conservation des aliments.

L'oxydation des lipides dans les produits d'origine animale est influencée par divers facteurs tels que la quantité d'acides gras polyinsaturés (AGPI), O₂, les ions métalliques, la température, l'éclairage, les pigments naturels, les processus mécaniques et l'addition de sel pendant le traitement. L'oxydation des lipides est initiée lorsque les AGPI réagissent avec l'O₂ moléculaire par l'intermédiaire d'un mécanisme de chaîne à radicaux libres formant des peroxydes, un grand nombre de composés sont générés pendant les processus d'oxydation, ce qui nuit à la qualité et à la sécurité des produits, ce qui limite la durée de conservation des aliments (**Djenane et al., 2001 ; Djenane et al., 2016**).

Dans les aliments d'origine animale (œufs, poisson, viande et lait), la détérioration de la qualité due aux processus oxydatifs des AGPI peut également être générée par un rayonnement à courte longueur d'onde (UV-A: 315-400 nm) qui est un promoteur efficace de la peroxydation lipidique (**Djenane et al., 2011a**). Pour prévenir ou retarder l'oxydation des lipides dans les aliments, les antioxydants peuvent être appliqués, Aujourd'hui, l'industrie alimentaire recherche de nouveaux antioxydants naturels économiques et efficaces qui peuvent remplacer les antioxydants synthétiques.

Le test TBA permet d'évaluer la formation des composés carbonylés, produits secondaires de l'oxydation des lipides, L'inhibition de l'activité de peroxydation lipidique dans l'OEL a été testée par le test SR-TBA.

Les valeurs initiales de SR-TBA des œufs entiers frais étaient de l'ordre de 0,05 mg MDA/kg (**Tableau 26**), L'activité de l'HE d'orange a été jugée dépendante de la dose utilisée. Les valeurs TBA des échantillons témoins ont augmenté rapidement tout au long du stockage en vitrine illuminée, Les résultats montrent qu'au 5^{ème} jour du stockage en vitrine illuminée, les échantillons contenant un niveau d'HE d'orange (0,5%) avaient des valeurs de TBA inférieures (taux de réduction = 69,73%) par rapport aux échantillons témoins, Cependant, à la fin de stockage, le taux de réduction enregistré était de l'ordre de 55,2%. Il s'avère que pendant toute la période de stockage,

les échantillons traités avec une faible concentration d'HE (0,1%) ont montré une forte valeur de SR-TBA qui était presque égale à celle du témoin. Nos résultats sont en concordance à ceux de **Viuda-Martos *et al.* (2011)** qui ont étudié l'effet de divers extraits de plantes à différentes concentrations sur l'oxydation des lipides dans les ovoproduits pendant le stockage, Il a été rapporté que le taux d'oxydation lipidiques était plus faible pour une concentration plus élevée d'extrait végétal.

Fernandez-Lopez *et al.* (2005) ont testé la poudre sèche d'orange à (0,5%) sur des boulettes de viande hachée du bœuf, ils ont signalé que ce traitement a permis de retarder efficacement l'apparition de la rancidité du produit mesurée par le test SR-TBA durant une période dépassant 12 jours de conservation.

La diminution de la concentration d'HE sans compromettre leur activité antioxydante peut également être obtenu en les appliquant en combinaison avec d'autres composés antioxydants qui fournissent un effet synergique (**Djenane *et al.*, 2011a**).

Tableau 26 : Valeurs TBA (mg MDA/kg d'OEL) et inhibition I%* (valeurs entre parenthèses) des OEL qui contiennent de l'HE d'orange valencia late pendant le stockage en vitrine illumine réfrigéré.

* Le taux d'inhibition en pourcentage (IR%) par rapport au témoin a été calculé comme suit :

Stockage (jours)	Témoin	OEL 0,1%	OEL 0,3%	OEL 0,5%
0	0,05 ± 0,006 ^{aW}	0,05 ± 0,006 ^{aW}	0,05 ± 0,006 ^{aW}	0,05 ± 0,006 ^{aW}
3	0,5 ± 0,09 ^{aX}	0,41 ± 0,06 ^{abX} (18,00%)	0,45 ± 0,04 ^{bX} (10,00%)	0,25 ± 0,06 ^{cX} (50,00%)
5	1,85 ± 0,11 ^{aY}	1,60 ± 0,08 ^{abY} (13,51%)	1,09 ± 0,06 ^{cY} (41,08%)	0,56 ± 0,08 ^{dXY} (69,72%)
8	2,5 ± 0,07 ^{aYZ}	2,05 ± 0,13 ^{abYZ} (18,00%)	1,58 ± 0,09 ^{bYZ} (36,80%)	1,12 ± 0,12 ^{cYZ} (55,20%)

$I(\%) = [(SR-TBA_C - SR-TBA_C) / SR-TBA_C] \times 100$, Où C'est le nombre de SR-TBA dans les échantillons non traités (Témoin) et T est le nombre de SR-TBA dans les échantillons traités,

^{a-d} Dans chaque ligne, différentes lettres en minuscules en exposant montrent des différences entre les groupes de traitements ($p < 0,05$),

^{w-z} Dans chaque colonne, différentes lettres majuscules en exposant montrent des différences entre les périodes de stockage dans le même groupe de traitement ($p < 0,05$),

OEL 0,1%: Œufs entiers liquides traités avec 0,1% d'HE d'orange,

OEL 0,3%: Œufs entiers liquides traités avec 0,3% d'HE d'orange,

OEL 0,5%: Œufs entiers liquides traités avec 0,5% d'HE d'orange.

III.6. Analyse microbiologique

Les œufs entiers sont susceptibles d'être contaminés par des microorganismes Gram-positifs et Gram négatifs (**Parisi et al., 2015**), la croissance microbienne étant considérablement décélérée en raison de la présence d'antimicrobiens naturels, en particulier le lysozyme et la conalbumine, dans la fraction blanc d'œuf (**Abeyrathne et al., 2013 ; Silveti et al., 2017**).

Cependant, la prévalence des microorganismes dans les ovoproduits tels que l'OEL est principalement due au manque de conditions d'hygiène lors de la manipulation, du stockage et durant la vente au détail. Les ovoproduits frais sont des produits qui sont soumis à une altération microbienne rapide en raison de leur nature délicate. L'évolution microbiologique dans les échantillons traités avec de l'HE d'orange lors de stockage en vitrine illuminée à 4 °C, sont présentés dans le **Tableau 27**.

Le nombre initial de bactéries psychrotrophes a été de 2,5 log UFC/ml, **Garcia-Gonzalez et al., (2009)** ont signalé 4,1 log UFC/g de charge microbienne initiale dans l'OEL frais,

Dans les premiers lots (0,1% et 0,2%), le traitement avec l'HE d'orange a été moins efficace par rapport au traitement 0,5%, Cependant, durant le stockage en vitrine illuminée, des changements importants ont été observés : la charge des Psychrotrophes a continuellement augmentée chez les échantillons du 1er lot (0,1%) et du 2ème lot (0,2%), tandis qu'un développement microbien plus lent a été observé pour le 3ème lot (0,5%). À la fin de la durée de conservation, le nombre de bactéries psychrotrophes dans les échantillons traités avec de l'HE a atteint 5,63 à 7,27 log UFC/ml.

Cependant, à cette même période de stockage des valeurs de 7,5 log CFU / ml ont été obtenues pour des échantillons non traités. Nous pouvons déduire de ces résultats qu'un traitement élevé (0,5%) a été aussi efficace pour assurer la stabilité microbienne pendant toute la durée de stockage en vitrine illuminée. Cependant, le seuil microbiologique n'a pas été dépassé même à la fin de la période de stockage (**< 7 log UFC/g**) et par conséquent notre ovoproduit frais est acceptable pour la consommation, même après une semaine de stockage en vitrine illuminée pour les deux traitements (0,2 et 0,5%) conformément aux directives microbiologiques.

Les résultats de ce travail ont montré que l'HE d'orange présente un puissant potentiel antimicrobien contre les microorganismes ; bactéries psychrotrophes responsables d'altération des OEL.

Tableau 27 : Les bactéries psychrotrophes (\log_{10} UFC/ml) dans les différents échantillons d'OEL durant un stockage en vitrine illuminée.

stockage (jours)	Témoin	OEL 0,1%	OEL 0,2%	OEL 0,5%
0	2,50 ± 0,06	2,50 ± 0,06	2,50 ± 0,06	2,50 ± 0,05
2	3,71 ± 0,08	3,60 ± 0,21	3,70 ± 0,15	3,50 ± 0,12
5	6,7 ± 0,23	6,60 ± 0,12	6,06 ± 0,18	5,40 ± 0,09
8	7,50 ± 0,19	7,27 ± 0,24	6,30 ± 0,09	5,63 ± 0,14

Un certain nombre d'études ont démontré le large spectre d'activités antimicrobiennes des espèces d'agrumes, en particulier les HEs d'orange contre un grand nombre de microorganismes (**Espina et al., 2011; Settanni et al., 2012**). Ce qui a été confirmé et étendu dans cette étude, bien que plusieurs études aient portées sur les propriétés antifongiques, seules quelques études ont évalué leur activité contre les bactéries d'altération des aliments. **Luciardi et al. (2016)** ont montré que les HEs des citrus peuvent être utilisés pour inhiber les facteurs de détection et de virulence du *quorum sensing* de *Pseudomonas aeruginosa* capable de produire des biofilms dans les systèmes alimentaires.

Selon **Espina et al. (2013)**, les HEs exercent une meilleure activité antimicrobienne à faible pH et à des faibles températures ; d'où l'importance de leur utilisation en conditions de réfrigération et/ou en présence d'acides organiques. On considère généralement que l'activité antibactérienne élevée des HEs et de leurs agents bioactifs augmente avec l'abaissement des valeurs de pH en raison de l'augmentation de

l'hydrophobicité de l'HE à faible pH. En conséquence, il existe une dissolution de l'HE plus facile dans les lipides de la membrane cellulaire bactérienne (**Juven et al., 1994**).

Friedly et al. (2009) ont constaté qu'une faible quantité d'HE des citrus combinée avec des acides organiques pourrait être efficace pour contrôler la croissance microbienne, **Pittman et al. (2011)** et **Pendleton et al. (2012)** ont également constaté que l'HE des citrus était efficace aux températures de réfrigération pour réduire la croissance de plusieurs souches de *E. coli* O157 : H7 isolées du bœuf. La poudre sèche d'orange et de citron à 5% (p/p) a été testée par **Fernandez-Lopez et al. (2005)** pour son potentiel antimicrobien dans les boulettes de viande bovine pendant une période de plus de 12 jours. Les HEs de Citrus ont également été étudiées pour leur capacité antibactérienne sur une période de 90 jours de stockage réfrigéré de la viande du bœuf (**Pittman et al., 2011**) et de sardine fraîche durant le stockage réfrigéré (**Djenane, 2015**).

L'HE *C. sinensis* est capable d'inhiber complètement la croissance d'*Aspergillus niger* à 3,0 mg/ml. L'huile a montré une activité fongistatique à 1,5 mg/ml avec un taux de 79% d'inhibition de croissance fongique après 7 jours d'incubation (**Sharma et Tripathi, 2008**). Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus par **Viuda-Martos et al. (2008)** qui ont démontré que *A. niger* est plus sensible à l'HE extraite de l'écorce d'orange (*C. sinensis* L). **Callaway et al. (2011)** et **Muthaiyan et al. (2012)** ont étudié les effets antimicrobiens de certains sous-produits d'industries d'agrumes contre les agents pathogènes alimentaires et ont constaté que plusieurs d'entre eux avaient des propriétés antimicrobiennes.

O'Bryan et al. (2008) ont testé 7 HEs des citrus pour leur capacité à inhiber la croissance de 11 sérotypes/souches de *Salmonella*. Ils ont conclu que les HEs d'orange ont révélé une grande action inhibitrice contre les *Salmonella spp.*

Nannapaneni et al. (2009) ont testé plusieurs HEs d'orange contre *Campylobacter jejuni* et *Arcobacter spp.* Ils ont constaté que l'huile d'orange pressée à froid était la plus efficace contre *C. jejuni*. Aucune inhibition d'*Arcobacter spp.* n'a été détectée. Certains auteurs ont déclaré que l'HE des Citrus peut agir en tant que promoteur de croissance, augmentent l'immunité et améliorent également la résistance aux maladies à l'infection par *Streptococcus iniae* chez les poissons. Ainsi, elles peuvent être utilisées comme un substituant des antibiotiques administrés aux aliments pour poisson (**Acar**

et al., 2015). **Federman *et al.* (2016)** a examiné les effets antimicrobiens de l'huile d'orange de Valencia pressée à froid. Les données suggèrent que l'huile d'orange a le potentiel d'être utilisée comme traitement préventif contre *S. aureus*, cause majeure de mastite contagieuse bovine et d'invasion de cellules mammaires bovines,

Plusieurs études ont montré que les bactéries Gram-positives sont plus sensibles à l'HE des citrus que les bactéries Gram-négatives (**Kivanc et akgul, 1986 ; Farag *et al.*, 1989; Tassou et Nychas, 1995 ; Chao *et al.*, 2000 ; Mann *et al.*, 2000 ; Ferhat *et al.*, 2010 ; Ruiz et Flotats, 2014**). La membrane externe de ces dernières contient des lipopolysaccharides hydrophiles, qui créent un obstacle vers des composés hydrophobes et des macromolécules, fournissant aux bactéries Gram négatives une tolérance plus élevée à des composés antimicrobiens hydrophobes comme ceux trouvés dans les HE (**Kivanc et akgul, 1986 ; Farag *et al.*, 1989 ; Tassou et Nychas, 1995 ; Chao *et al.*, 2000 ; Mann *et al.*, 2000 ; Ferhat *et al.*, 2010**).

Contrairement à toutes les attentes, **Lin *et al.* (2010)** ont montré que les HES d'orange pouvaient efficacement inactiver certaines bactéries Gram négatives telles que *V. parahaemolyticus*, *S. Typhimurium* et *E. coli* mais pas *S. aureus* (Gram positive).

Malgré le potentiel démontré des HES et de leurs constituants en phase liquide, leur utilisation comme conservateur dans les aliments a été limitée parce que des concentrations élevées sont nécessaires pour obtenir une activité antimicrobienne satisfaisante (**Burt, 2004 ; Djenane *et al.*, 2012a**). Les facteurs intrinsèques complexes présents dans les matrices alimentaires peuvent potentiellement diminuer l'efficacité des HES. **Smith-Palmer *et al.* (1998)** ont constaté que les aliments ayant une teneur plus élevée en lipides nécessitaient une concentration élevée en HE pour inhiber la croissance bactérienne. Ceci aurait un impact négatif sur les qualités organoleptiques causé par la présence de l'HE à un seuil critique. Les possibilités de synergies entre plusieurs composés ont été suggérées comme une solution à ce problème. La synergie entre les HES et d'autres composés devra également être étudiée en tant que systèmes antimicrobiens avant qu'ils ne puissent être appliqués dans le secteur alimentaire. Le limonène par exemple pourrait être combiné avec succès avec d'autres technologies de conservation thermique afin d'obtenir un effet synergique par l'inactivation des microorganismes. A cette fin, l'application prévue d'une technologie de conservation

non-thermique nécessitant des dommages subalternes au niveau de la membrane externe des bactéries cibles augmenterait l'effet létal induit par le limonène, conduisant à un processus combiné utile (Espina *et al.*, 2013). Zhang *et al.*, (2014) ont signalé que la combinaison de la nisine et de D-limonène a engendré des effets de synergie antimicrobienne contre les agents pathogènes.

Une concentration plus élevée en composés phénoliques tels que les monoterpènes présents dans l'HE pourrait être responsable de l'activité antimicrobienne. L'activité antibactérienne de l'HE d'orange étudiée peut être attribuée à plusieurs molécules, entre autres le limonène, constituant majeur des HEs des citrus (Djenane, 2015). Il a été rapporté que le limonène exerce une activité antimicrobienne vis-à-vis de plusieurs souches (Di Pasqua *et al.*, 2006 ; Chee *et al.*, 2009; Espina *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014). Des recherches antérieures sur l'activité antibactérienne du limonène ont été principalement axées sur ses activités bactériostatiques et bactéricides contre les agents pathogènes alimentaires (Vuuren et Viljoen, 2007 ; Espina *et al.*, 2013), mais on connaît pas autant sur son activité antibactérienne dans la conservation des aliments.

Compte tenu du grand nombre de divers groupes de composés chimiques contenus dans les HEs, il est plus probable que leur activité antibactérienne soit imputable aux enveloppes de cellules spécifiques bactériennes cibles (Burt, 2004). Pour expliquer les mécanismes d'action des molécules bioactives contenues dans les huiles, l'action antimicrobienne de ces molécules pourrait être attribuée à leur capacité à pénétrer à l'intérieur de la cellule par les membranes bactériennes et, par conséquent, à exercer une action inhibitrice sur les propriétés fonctionnelles de la bactérie (Fisher et Phillips, 2009).

III.7. Analyse sensorielle

La production de saveur ou d'odeur forte limite l'utilisation d'HE comme conservateur d'aliments pour augmenter la durée de conservation des produits alimentaires. L'utilisation des HEs comme agents biologiques dans l'industrie alimentaire pourrait affecter les propriétés organoleptiques des produits, de sorte que l'obtention d'un meilleur effet biologique en utilisant une faible concentration d'HE est essentielle. Ainsi, des tests sensoriels par un panel formé seraient nécessaires dans certains cas pour élucider cet aspect.

En ce qui concerne l'intensité de l'odeur d'orange (**Tableau 28**), les dégustateurs ont attribué aux échantillons OEL 0,5% un score initial de 3 (Jour 0), tandis que les échantillons 0,1% et 0,2% ont reçu un score $< 2,2$ pendant toute la période de stockage en vitrine illuminée, représentatif d'une odeur d'orange acceptable. Il apparaît évident que l'intensité de l'odeur d'orange diminue avec le temps de stockage illuminé ; pas plus perceptible après 5 jours ($p < 0,05$) et a atteint des valeurs acceptables pour tous les échantillons. D'un point de vue pratique, la présence de l'HE d'orange dans l'ovoproduit est sans effet sur les caractéristiques organoleptiques.

Cependant l'HE d'orange a exercé un effet quant aux scores sensoriels attribués concernant « *mauvaise odeur* » ($p < 0,05$). Durant toute la période de stockage illuminé, les échantillons non traités avec l'HE d'orange ont reçu des scores « *mauvaise odeur* » ($p < 0,05$) supérieurs. En général, les valeurs de SR-TBA ont été corrélées avec la perception sensorielle par le consommateur dans le cas des produits d'origine animale (**Djenane *et al.*, 2011**). L'augmentation de « *mauvaise odeur* » chez les échantillons témoins était probablement due au phénomène de rancidité générée par les réactions d'oxydation des lipides, comme le montrent les valeurs de SR-TBA, ce qui pourrait être facilement perçu par les panélistes, Il serait également probable que la « *mauvaise odeur* » perçue par les panélistes est également due au développement microbien, comme en témoignent les dénombrements des bactéries psychrotrophes.

Au 5^{ème} jour de stockage, les échantillons témoins ont été évalués par les panélistes avec un score de rejet (score ~ 4), tandis que les échantillons contenant des quantités élevées en l'HE d'orange (0,2 et 0,5%) ont été évalués par les panelistes avec des scores loin des limites de rejet ($P < 0,05$) et, ce ci pendant toute la période de stockage. L'activité antioxydante peut être attribuée à la présence de composants chimiques ; les monoterpènes contenus dans cette HE peuvent agir comme agents bioactifs et éviter une perte de qualité sensorielle. Dans certaines conditions, l'arôme intense des HEs, même à de faibles concentrations, peut provoquer des effets organoleptiques négatifs dépassant le seuil acceptable pour les consommateurs. Au cours des dernières décennies, différentes stratégies ont été utilisées pour résoudre ce problème. Une option consiste à utiliser des extraits de plantes dans des emballages actifs plutôt que comme un ingrédient du produit lui-même. Les HEs peuvent être encapsulés dans des polymères de revêtements comestibles et biodégradables qui fournissent une libération

lente à l'espace libre des emballages alimentaires et par conséquent à la surface alimentaire (Camo *et al.*, 2011; Djenane *et al.*, 2016).

Tableau 28 : Attributs sensoriels* d'odeur d'orange et *mauvaise odeur* mesurés sur OEL en présence d'HE d'orange valencia late, durant le stockage en vitrine illuminée.

Paramètres	Durée de stockage (jours)				
		0	3	5	8
Odeur de <i>Citrus sinensis</i> L.	Témoin	1,00 ± 0,00 ^{aA}	1,00 ± 0,00 ^{aA}	1,00 ± 0,00 ^{aA}	1,00 ± 0,00 ^{aA}
	OEL 0,1%	1,00 ± 0,00 ^{aA}	1,00 ± 0,00 ^{aA}	1,00 ± 0,00 ^{aA}	1,00 ± 0,00 ^{aA}
	OEL 0,2%	2,17 ± 0,41 ^{aB}	2,17 ± 0,41 ^{aB}	1,17 ± 0,41 ^{bA}	1,00 ± 0,00 ^{bA}
	OEL 0,5%	3,00 ± 0,00^{aC}	2,83 ± 0,41^{aC}	1,33 ± 0,52 ^{bAB}	1,17 ± 0,41 ^{bA}
<i>Mauvaise odeur</i> **	Témoin	1,00 ± 0,00 ^{aw}	2,33 ± 0,52 ^{bw}	3,67 ± 0,52^{cw}	4,17 ± 0,41^{cdw}
	OEL 0,1%	1,00 ± 0,00 ^{aw}	2,17 ± 0,41 ^{aw}	3,00 ± 0,00^{bwx}	3,33 ± 0,00^{bwx}
	OEL 0,2%	1,00 ± 0,00 ^{aw}	2,17 ± 0,52 ^{bw}	2,33 ± 0,52 ^{bcy}	2,33 ± 0,52 ^{bcy}
	OEL 0,5%	1,00 ± 0,00 ^{aw}	2,00 ± 0,00 ^{bx}	2,17 ± 0,41 ^{by}	2,33 ± 0,52 ^{bcy}

*Un score < 3 dans l'un des deux paramètres signifie que OEL est acceptable. Lorsque le score ≥ 3 dans l'un des deux paramètres indique que OEL peut être rejeté (Fin de la durée de conservation),

^{a-d} Les valeurs moyennes dans la même ligne (entre les jours de stockage) issues en exposant avec des lettres différentes diffèrent, significativement ($p < 0,05$),

^{A-C} Les valeurs moyennes de l'odeur à *Citrus sinensis* L, dans la même colonne (entre les traitements) issues en exposant avec des lettres différentes, diffèrent significativement ($p < 0,05$),

^{w-y} Les valeurs moyennes de la mauvaise odeur dans la même colonne (entre les traitements) issues en exposant avec des lettres différentes, diffèrent significativement ($p < 0,05$),

**mauvaise odeur : fait référence à l'intensité des odeurs associées à l'oxydation du produit et au développement microbien : 1 = aucune ; 2 = légère ; 3 = faible ; 4 = modéré ; et 5 = extrême,

III.8. Couleur des OEL

A des valeurs positives, l'indice CIE a* indique des couleurs rouges, cependant, aux valeurs négatives, les couleurs sont vertes, L'indice CIE b * prend des valeurs positives pour le jaune et le négatif pour le bleu, Enfin, le paramètre CIE L * est une mesure approximative de la luminosité. Chacun des paramètres de couleur mentionnés ci-dessus est directement associé à certains critères de qualité du produit en question, par exemple la composition du produit, le pH, la capacité de rétention d'eau et la texture, La couleur de l'OEL est un concept d'une importance pratique. L'industrie des œufs nécessite des ovoproduits liquides homogène du point de vue couleur et ceci pour satisfaire la demande de l'industrie alimentaire. Les clients peuvent ne pas accepter la décoloration d'un produit causée par un stockage prolongé. Pour cette raison, les antioxydants synthétiques sont habituellement ajoutés aux œufs liquides pour atteindre la couleur souhaitée et rendre les produits plus attrayants pour les consommateurs et plus adaptés pour l'industrie des ovoproduits. La perception des couleurs dépend fortement des propriétés chimiques, microbiennes et la nature des composantes du produit. Il a été décrit que la dénaturation de certaines protéines, lipides et pigments, qui se produit pendant le stockage, explique les principaux changements de couleur survenus dans les produits alimentaires d'origine animale durant leur stockage réfrigéré (De Souza et Fernandez, 2011 ; Djenane *et al.*, 2011).

Les changements les plus évidents lors du stockage des œufs liquides sont généralement liés à la couleur. Les résultats concernant les traitements avec l'HE d'orange sont enregistrés au **Tableau 29**. Le traitement en HE avec une concentration de 0.5% a permis d'avoir des indices rouge (CIE a *) et jaune (CIE b *) modérément supérieurs pendant le stockage par rapport aux témoins, ce qui a entraîné une augmentation de la couleur orange du produit. En outre, l'indice L * a diminué avec le temps d'exposition. Les échantillons témoins étaient relativement plus foncés que les autres. Dans des produits similaires, **De Souza et Fernandez (2011)** ont observé la même tendance pour les indices de couleur CIELab. Ces changements de couleur sont généralement associés à la présence d'HE, ce qui est évident lors de stockage illuminé. Les résultats obtenus sur la couleur sont en concordance avec ceux des tests physico-chimiques et microbiologiques des OEL au cours du stockage.

Tableau 29: Indices de couleur CIE L*, a* et b* dans des OEL traitées avec HE d'orange valencia late.

Produit	Durée de stockage (jours)	L*	a*	b*
Témoin	0	65,12 ± 1,52	13,50 ± 2,01	41,21 ± 0,99
	3	64,45 ± 0,88	11,10 ± 1,11	40,61 ± 1,07
	5	60,72 ± 1,01	09,20 ± 2,01	36,58 ± 0,89
	8	59,52 ± 0,68	09,04 ± 0,99	36,02 ± 0,25
OEL 0,1%	0	65,52 ± 0,54	13,80 ± 1,01	41,19 ± 0,99
	3	64,92 ± 1,88	13,40 ± 1,31	40,42 ± 0,49
	5	63,72 ± 1,31	11,10 ± 0,05	37,98 ± 0,69
	8	63,08 ± 0,81	10,03 ± 1,99	36,10 ± 0,15
OEL 0,2%	0	65,35 ± 0,32	13,90 ± 1,01	41,20 ± 0,21
	3	65,12 ± 1,08	13,25 ± 1,41	40,88 ± 0,32
	5	65,08 ± 1,25	13,08 ± 0,55	40,08 ± 0,60
	8	63,73 ± 0,51	12,23 ± 0,95	39,10 ± 0,05
OEL 0,5%	0	65,12 ± 1,52	13,50 ± 2,01	41,28 ± 0,99
	3	66,22 ± 0,48	13,62 ± 1,12	41,42 ± 0,69
	5	65,09 ± 0,23	13,59 ± 0,05	41,55 ± 1,08
	8	64,69 ± 0,05	13,50 ± 2,11	40,89 ± 2,19

*Chaque échantillon a été mesuré dans 10 positions différentes ; les résultats sont la moyenne de trois répliques indépendantes.

*- Luminance (L).

*- Indice de rouge « a »

*- Indice de jaune « b ».

III.9. Vie utile du produit *shelf life*

La qualité des produits alimentaires est liée à des facteurs biologiques, chimiques et sensoriels. La *durée de vie* des OEL est déterminée en fonction de toutes ces propriétés : sensorielle (note attribué : une note < 3 dans pour paramètre "*mauvaise odeur*" indiquant que le produit est acceptable ; chimique (valeur SR-TBA : limite ~ 1,5 mg MDA/kg) et microbiologique (Bactéries psychrotrophes aérobies : limite ~ 7 log₁₀ UFC/g). La *durée de vie* d'un produit est défini comme "la période entre la préparation des OEL à l'échelle laboratoire et le moment de l'échantillonnage, au cours de laquelle le produit est dans un état de qualité satisfaisante en termes de ces propriétés chimiques, microbiologiques et sensorielles". **Singh et al, (2010)** ont recommandé l'HE de *C. sinensis* et DL-limonène pour prolonger la durée de vie des produits stockés. Dans un récent travail, l'enrobage avec de la gélatine enrichi d'HE d'orange a des effets perceptibles sur la qualité et la durée de conservation des crevettes (**Alparslan et al., 2016**).

Le stockage illuminé de OEL a démontré que l'HE d'orange était nécessaire pour obtenir une augmentation significative de la *durée de vie* au cours de l'entreposage (**Tableau 30**), Il était évident que les attributs qualitatifs pendant la période stockage illuminé dépendaient de la concentration d'HE d'orange ajoutée dans le produit. La stabilité chimique, microbiologique et sensorielle du produit pendant toute la période de stockage a été influencée positivement par le traitement avec l'HE. La *durée de vie* du produit a été prolongée jusqu'à 1 semaine. La stabilité de la qualité des OEL pendant le stockage illuminé était plus élevée lors d'un traitement avec des concentrations supérieures en HE d'orange. Par conséquent, les résultats obtenus dans ce travail pourraient être considérés comme une technologie prometteuse pour allonger la durée de conservation commerciale des œufs liquides.

Tableau 30 : Les Critères proposés pour l'estimation de la date d'expiration (duré de conservation ; vie) ** de OEL.

Paramètre Oxydatif	Fin de la durée de conservation (mg MDA/kg)	Paramètre d'odeur	Fin durée de la conservation (note : <i>mauvaise odeur</i>)	Paramètre Microbiologique	Fin de duré de conservati on (\log_{10} UFC/ml)	Paramètre de couleur	Fin durée de la conservation (indice de couleur)
SR-TBA	$\geq 1,5$	<i>Mauvaise odeur</i>	≥ 3	Bactéries psychrotrophes aérobies	≥ 7	- (L*) - (a*) - (b*)	< 64 < 13,50 < 41

** Lorsque les paramètres d'oxydation, sensoriel, microbiologique et de l'indice de couleur à la fin de la durée de conservation dépassent les valeurs guides, les produits peuvent être rejetés,

*- Luminance (L).

*- Indice de rouge « a »

*- Indice de jaune « b ».

Il est évident que les constituants isolés séparément des HEs peuvent jouer un rôle important dans l'activité biologique de ces dernières (**Nazer *et al.*, 2005 ; Guillier *et al.*, 2007 ; Dubois-Brissonnet *et al.*, 2008**). Cependant, le principal obstacle à l'utilisation de constituants séparés en tant que conservateurs alimentaires est le fait qu'à l'état séparé ne sont pas très efficaces, et ils provoquent des effets organoleptiques négatifs lorsqu'ils sont ajoutés en quantité suffisante pour produire un effet biologique satisfaisant.

L'industrie alimentaire utilise principalement les HEs comme des produits aromatisants. Cependant, l'application d'HE comme conservateur d'aliments nécessite une connaissance détaillée de leurs propriétés, à savoir la gamme des organismes cibles, le mode d'action et l'effet des composants de la matrice alimentaire sur les propriétés antimicrobiennes et antioxydantes des HEs. Une gamme de composants d'HE a été déjà acceptée par la Commission Européenne pour leur utilisation prévue comme aromatisants dans les produits alimentaires tels que le **limonène** qui est considéré comme une **substance sans risque** pour la santé du consommateur. Food and Drug Administration des États-Unis (FDA) classe également ces substances comme généralement reconnues comme sûres (GRAS). La valeur élevée obtenue de DL50 de l'huile de *C. sinensis* administrée oralement chez la souris indique son non toxicité pour les mammifères (**Singh *et al.*, 2010**).

En outre, les différents constituants peuvent interagir, provoquant des effets synergiques, antagonistes, indifférents et additifs. Une étude comparative des constituants de l'HE pourrait aider à comprendre les points clés de l'activité biologique des HEs, agissant seul ou en combinaison avec d'autres techniques de préservation des aliments.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif principal de ce travail était d'étudier un nouveau procédé de distillation des HE assistée par micro-ondes (ESSAM) et de l'appliquer aux variétés d'agrumes algériennes. Notre but était d'améliorer ce nouveau système tout en diminuant les durées d'extraction, en simplifiant les protocoles opératoires et en élaborant une technique d'extraction des huiles essentielles applicable en particulier, aux agrumes et aux tout type de végétaux. Les travaux d'élaboration du prototype d'extraction ont été réalisés dans le but d'optimiser d'un point de vue quantitatif mais aussi qualitatif la technique d'extraction. Basée à la fois sur un concept de distillation sans solvant, sans eau et sur le principe du chauffage micro-ondes.

L'ESSAM présente de nombreux avantages pour l'obtention d'HEs de qualité comparée aux méthodes conventionnelles souvent longues et fastidieuses. La rapidité d'exécution, la spécificité du chauffage micro-ondes, l'économie d'énergie, la simplicité de mise en œuvre sont les principaux atouts de l'ESSAM. De plus, la singularité des profils aromatiques des huiles essentielles obtenues par l'extraction sans solvant assistée par micro-ondes offre aux parfumeurs et concepteurs de nouvelles fragrances et de nouvelles perspectives de création grâce à une palette de senteurs encore plus large.

La comparaison des rendements des HEs extraite par l'ESSAM avec l'expression à froid et l'hydrodistillation des huiles essentielles d'agrumes a permis de mettre en évidence des différences de comportement selon la nature de la matrice. En effet, l'ESSAM est vraiment plus efficace, il est possible d'extraire en une demi-heure, la même quantité d'HE extraite par méthode conventionnelle L'hydrodistillation en 3 heures.

D'un point de vue de la qualité des HEs l'ESSAM est incontestablement une méthode de choix. Une essentielle variabilité a été constatée dans les proportions de la fraction oxygénée selon la technique d'extraction employée. Nous avons enregistré pour cette méthode une composition plus riche en composés oxygénés en la comparant à celle issue des méthodes conventionnelles, composés nettement plus valorisables sur le plan olfactif.

Les travaux menés par notre étude ont permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme pour l'extraction par micro-ondes. La température d'ébullition des

molécules n'explique pas à elle seule le phénomène de distillation, la solubilité des composés dans l'eau serait un facteur déterminant pour l'extraction des composés aromatiques et de leur distillation. C'est ainsi que dans le cas de l'extraction par micro-ondes, les composés oxygénés plus polaires et plus solubles dans l'eau seraient distillés prioritairement aux hydrocarbures terpéniques dont la température d'ébullition est pourtant plus faible.

Dans un dernier temps, une approche écologique et une compréhension détermination des phénomènes mis en jeu pour l'extraction des HES par ESSAM ont été abordées. La limitation des eaux usées, la rapidité de la procédure, la réduction du coût énergétique font d'ESSAM une technique innovante et attrayante. De plus, la procédure requiert les micro-ondes comme unique source d'énergie; aucune source de chaleur additionnelle n'est requise. Cette méthode permet également une distribution et un transfert de masse et de chaleur depuis le cœur de la matrice vers l'environnement. C'est l'inverse dans le cas du procédé conventionnel, la chaleur est tout d'abord transférée à l'extérieur du milieu et se dirige vers l'intérieur de la matrice. Ainsi, le transfert de masse s'effectue de l'intérieur de la matrice vers l'extérieur alors que le gradient de température intervient depuis l'extérieur vers l'intérieur. La technique permet de réduire considérablement les temps d'extraction sans altérer la composition des extraits. De plus, cette méthode fait un pas en direction des économies d'énergie et du développement durable : méthode non utilisatrice ni de solvant ni d'eau, diminution de la consommation énergétique, donc elle apparaît comme étant une procédure dite « verte ».

L'utilisation de la réfrigération pour assurer la conservation des denrées alimentaires et préserver les qualités organoleptiques des produits favorise l'émergence de flores microbiennes psychrotrophes malgré cela qui continue à coloniser toujours le substrat. Les bactéries psychrotrophes, les agents de nombreux types d'altérations des denrées réfrigérées. Ce constat ne remet pas fondamentalement en cause le recours à la réfrigération, mais motive une utilisation raisonnée de ce procédé. Une parfaite maîtrise de la chaîne du froid, garantissant une température inférieure à +2°C, est indispensable et constitue une étape majeure pour la mise en place de plans d'assurance de la sécurité dans les entreprises agro-alimentaires. Une attitude responsable est aussi nécessaire de la part de tous les intervenants des filières de production et de distribution, afin que la durée de vie des produits alimentaires soit fixée sur la base d'études scientifiques

sérieuses plutôt qu'en fonction d'arguments commerciaux. Les HEs sont des substances aromatiques, d'une composition chimique complexe, ce qui leur confère des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes très intéressantes à mettre à profit dans la préservation des produits alimentaires.

Ainsi Par le biais de cette étude nous avons essayé de mettre en évidence la possibilité d'utilisations des HEs des citrus écorces d'Orange (valencia late) comme agent naturel bioconservateur d'un ovoproduit frais (OEL). Au cours de cette étude, nous avons pu dégager les conclusions suivantes :

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle d'orange «*in vitro*» par les méthodes de réduction du DPPH° a montré que cette huile essentielle possède un pouvoir antioxydant, donc son emploi dans OEL pourrait constituer un moyen possible de prévention de l'oxydation des lipides. L'incorporation de l'huile essentielle d'orange à haute concentration (0,5%) a permis une meilleure conservation du produit durant le stockage en vitrine illuminée.

D'après l'ensemble de ces résultats, nous pouvons conclure que l'HE d'orange semble être plus appropriée comme agent antioxydant et aromatique dans OEL.

Même si ce travail a permis d'étudier les caractéristiques biologiques de l'huile essentielle de l'orange et d'explorer la possibilité de son utilisation comme agent bioconservateur dans OEL. Beaucoup de questions mériteraient d'être traitées, donc il serait souhaitable :

- D'étudier leur comportement vis-à-vis de l'huile essentielle d'orange sur des germes pathogène afin de confirmer l'efficacité ou non des HEs de *Citrus*.
- Effet sur la composition et la qualité technologique des protéines de l'œuf pour les produits de biscuit a pate jaune foisonée.
- D'extraire les composants actifs de l'huile essentielle et de les appliquer directement ou en synergie avec d'autre composant dans l'OEL.
- L'utilisation des films d'emballage naturels biodégradables et bioactifs après incorporation d'extraits végétaux antimicrobiens et/ ou antioxydants pour assurer l'innocuité et augmenter significativement la durée de conservation des aliments à la

place de certains conservateurs ou antioxydants de synthèse pourrait être envisagée dans le domaine de l'industrie agro-alimentaire.

Références bibliographiques

Abeyrathne E.D.N.S., Lee H.Y., and Ahn D.U., 2013. Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents-A review. *Poultry Science*. **92**, 3292-3299

Acar U., Kesbiç O. S., Yılmaz S., Gültepe N., and Türker A., 2015. Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromismossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. *Aquaculture*, **437**, 282–286.

Adams R.P., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.

AFNOR., 2000. Association française de normalisation. Normes françaises : huiles essentielles. AFNOR, Paris.

Aghel N, Yamini Y, Hadjiakhoondi A. et Mahdi Pourmortasavi S., 2004. Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Talanta*, **62**, 407-411.

Ait Abdelouahab N ., 2001. Microbiologie alimentaire .Ed, office. Publications universitaires. Alger. P 147 .

Alonzo G., Fatta Del Bosco S., Palazzolo E., Saiano F., and Tusa N., 2000. Citrus cybrid leaf essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*, **15**, 91–95.

Alparslan Y., Yapıcı H. H., Metin C., Baygar T., Günlü A., and Baygar T., 2016. Quality assessment of shrimps preserved with orange leaf essential oil incorporated gelatine. *LWT-Food Science and Technology*, **72**, 457-466.

Altuntas A., and Aydin R., 2014. Fatty acid composition of egg yolk from chickens fed a diet including marigold (*Tagetes erecta* L.). *J. Lipids*, 564851.

Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Aarab L., El AJJOURI M., and Chaouch A., 2010. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* , **14** (1), 141-148.

Andersson A., Rönner, U., and granum, P. E., 1995. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*?. *International Journal of Food Microbiology*, **28**, 145-155.

Anizon J.Y., Lemaire B., et Surbled M., 2003. Extraction assistée par micro-ondes. *Technique de l'Ingénieur, traité Agroalimentaire F 3 060*.

Aprotosoiaie A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F., Dorneanu V. and Stanescu U., 2010. The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *farmacia*, **58** (1), 46-54

A.O.A.C .Association of Official Analytical Chemists, 2000. Official methods of analysis, 17th ed, USA, pp. 1980e1984. (MOISTURE CONTENT).

Avlessi F., Alitonou G.A., Djenontin T S., Tchobo F., Yèhouénu B., Menut C. and Sohounhloué D., 2012. Chemical composition and Biological activities of the Essential oil extracted from the Fresh leaves of *Chromolaena odorata* (L. Robinson) growing in Benin. *ISCA Journal of Biological Sciences*, **1**(3), 7-13.

Bacanlı M., Basaran A. A., and Basaran N., 2015. The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin. *Food Chemical Toxicology*, **81**, 160-170.

Bagheri H., Abdul Manap M. Y. B., and Solati Z., 2014. Antioxidant activity of Piper nigrum L. essential oil extracted by supercritical CO₂ extraction and hydro-distillation. *Talanta*, **121**, 220-228.

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., 2008. Biological effects of essential oils- A review. *Food Chem Toxicol.*, **46**, 446-475.

Bampouli A., Kyriakopoulou K., Papaefstathiou G., Louli V., Aligiannis N., Magoulas K., and Krokida M., 2015. Evaluation of total antioxidant potential of Pistacia lentiscus var. Chia leaves extracts using UHPLC–HRMS. *Journal of Food Engineering*, **167**, 25-31.

Baron F., Cochet M.F., Grosset N., Madec M.N., Briandet R., Dessaigne S., Baron F., et Jan S., 2010. Microbiologie de l'œuf et des ovoproduits INRA Prod. Anim., **23** (2), 193-204

Bauer W. J., Badoud R., Löliger J. and Etournaud A., 2010. Science et technologie des aliments : Principes de chimie des constituants et de technologie des procédés. Edition PPUR Presses polytechniques, p 212.

Benediste A. et Baches M., 2002. Agrumes. Ed. Ugen Ulmer, PARIS, n° 132, 96 p.

Bernadet M., 1983. Phyto-aromathérapie pratique, usage thérapeutique des plantes médicinales et huiles essentielles, Eds. Dangles, France. 384 p.

Bernard T., Perinau F., Brav O., Delmas M., Gaset A., 1988. Extraction des huiles essentielles. Chimie et technologie. In Information chimie,179-184.

Bernard J., 2001. Sciences et vie.214, 68.

Berset C. and Cervelier M.E., 1996. Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidizing power. *Sciences des Aliments*, **16**, 219-245.

Blanco Tirado C., Stashenko E. E., Combariza M. Y., and Martinez J. R., 1995. Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **697**, 501-513.

Blondel L., 1978. *Fruits*, **33**, 695.

Blum J.C., et Sauveur B., 1996. Caractéristiques et qualité de l'œuf de poule. Cah. Nut. Diét., **31**, 369-378.

Bornert G., 2000 .Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires, Service Central d'Études et de Réalisations du Commissariat de l'Armée de Terre, B.P. 309, 00447 Armées, Revue Méd. Vét., 151, 11, 1003-1010.

Boukroufa M., Boutekedjiret C., Petigny L., Rakotomanomana N., and Chemat F., 2015. Bio-refinery of orange peels waste: A new concept based on integrated green

and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin. *Ultrasonics Sonochemistry*, **24**, 72–79.

Bourgeois C. M., Gestin L., Protais J., 1994. Microbiologies de l'œuf et des ovoproduits chapitre 2, 110-131, l'œuf et les ovoproduit, ed tec et doc Lavoisier.

Bourgeois C., Mescle J.-F. et Zucca J., 1996. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments, 672 pages, Lavoisier Editeur, Paris.

Bourkhiss M., Hnach M., Bourkhiss B., Ouhssine M. et Chaouch A., 2007. Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc, *Afrique Science*. **3** (2), 232-242.

Bousbia N., 2004. Extraction et identification de quelques huiles essentielles (nigelle, coriandre, origan, thym, romarin), étude de leurs activités antibactériennes. Thèse de Magistère. Option *Sciences Alimentaires*, INA. Algérie.

Bousbia N., Abert Vian M., Ferhat M.A., Petitcolas E., Meklati B. Y., Chemat F., 2009. Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chemistry*, **114**, 355-362.

Bouvarel I., Nys Y., Panheleux M., et Lescoat P., 2010. Comment l'alimentation des poules influence la qualité des œufs ? In : Numéro Spécial, Qualité de l'œuf. Nys Y. (Ed). *Inra Prod. Anim.*, **23**, 167-182.

Bouzouita N., Kachouri F., Ben Halima M. et Chaabouni M.M., 2008. Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*, *J. Soc. Chim. Tunis.*, **10**, 119-125.

Boyd B., Ford C., Koepke C., Horn E., McAnalley S., et McAnalley B., 2003. Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *glyoScience et Nutrition*, **4** (6), 7p.

Branger A., Rricher M. M., et Roustel S., 2007. Coordination Microbiochimie et alimentation. p75.

Burt S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food Microbiology*, **94**, 223–253.

Bustamante J., van Stempvoort S., García-Gallarreta M., Houghton J. A., Briers H. K., Budarin V. L., Matharu A. S., and Clark J. H., 2016. Microwave assisted hydro-distillation of essential oils from wet citrus peel waste. *Journal of Cleaner Production*, **137**, 598-605.

Caccioni D. R. L., Guizzardi M., Biondi D. M., Renda A., and Ruberto G., 1998. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology*, **43**, 73-79.

Callaway T. R., Carroll J. A., Arthington J. D., Edrington T. S., Anderson R. C. and Ricke S. C., 2011. Citrus products and their use against bacteria: potential health and cost benefits (chap. 17). In R. Watson J. L. Gerald and V. R. Preedy (Eds.), *Nutrients, dietary supplements, and nutraceuticals: Cost analysis versus clinical benefits* (pp. 277-286). New York, NY: Humana Press.

Camo J., Djenane D., Beltrán J.A., and Roncalés P., 2011. Display life of beef packaged with an antioxidant active film as a function of the concentration of oregano extract. *Meat Science*, **88**, 174-178.

Cano N., Barnoud D., Schneider S. M., Vasson M. P., Hasselmann M. et Leverve X., 2006. *Traité de nutrition artificielle de l'adulte. Edition Springer*, p 255.

Carson C.F., Mee B.J. and Riley T.V., 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46**, 1914-1920.

Catteau M., 1999. Pathogènes rencontrés lors de la conservation par le froid. In : *La microbiologie prévisionnelle appliquée à la conservation des aliments réfrigérés*, 333 pages, Office des publications officielles des Communautés européennes Editeur, Luxembourg.

Cerf O., 1977. Tailing of survival curves of bacterial spores, *J. Appl. Bacteriol.* **42**, 1-9.

Chang Y.I., and Chen T.C., 2000. Functional and gel characteristics of liquid whole egg as affected by pH alteration. *Journal of Food Engineering*, **45**, 237-241.

Chapot TH., 1962. Le Bergamotier, *Al Awamia*. **5**, 1-27.

Chee H.Y., Kim H. and Lee M.H., 2009. In vitro antifungal activity of limonene against *Trichophyton rubrum*. *Mycobiology*, **37**, 243-246.

Chemat F., Abert-Vian M., and Dangles O., 2007. Essential oils as antioxidants. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, **1**, 4-15.

Chemat F., Lucchesi M. E., Smadja J., Faveretto L., Colnaghi G., and Visinoni F., 2006. Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. *Analytica Chimica Acta*, **555**, 157-160.

Chemat F., Smadja J., and Lucchesi M. E., 2004(a). Lösungsmittelfreie Mikrowellen- Extraktion von flüchtigen Naturstoffen. *Brevet Européen*, EP 1 439 218 A1.

Chemat F., Smadja J., and Lucchesi M. E., 2004(b). Solvent-free microwave extraction of volatile natural substances. *Brevet Américain*, US 2004/0187340 A1.

Chemat S., 2005. Contribution à l'étude de l'extraction de la carvone et du limonène à partir des graines de Carvi selon des procédés conventionnels, ultrasons et chauffage micro-ondes : Application à l'extraction de polluants organiques de type PCBs et à l'oxydation des acides humiques. Thèse de Doctorat USTHB.

Chen Q., Hu Z., Yao F.Y.D., and Liang H., 2016. Study of two-stage microwave extraction of essential oil and pectin from pomelo peels. *LWT - Food Science and Technology*. **66**, 538-545.

Chen S.S., and Spiro M., 1995. Kinetics of microwave extraction of Rosemary leaves in hexane, ethanol, and a hexane+ethanol mixture. *Flav Fragr J.*, **10**, 101-112.

Cheng S., Huang C., Chen Y., Yu J., Chen W., and Chang S., 2009. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two eucalyptus species, *Bioresour. Technol.*, **100**, 452-456.

Chutia M., Deka Bhuyan P., Pathak M.G., Sarma T.C., and Boruah P., 2009. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT-Food Science and Technology*, **42**, 777-780.

CIE., 1978. International commission on illumination. Recommendations on uniform color spaces, color difference equations, psychometric color terms. Supplement No. 15 to CIE publication No. 15 (E-1.3.1) 1971/(TO-1.3). 1978; Paris, France. environmentally friendly approach. *Analytica Chimica Acta*, **555**, 157-160.

Clevenger J. F., 1928. *Amer. Perf. Essent. Oil Rev.* 467.

Cocorin N., et Guerin C., 2003. Valorisation chimique du végétal : les agrumes.

Commission du codex alimentarius. CX/FH 03/10 Septembre 2002.

Copin M. P., Nau F., Roignant M., Audiot V., et Painvin A., 1994. Transformation décontamination et stabilisation ,134-185, ed tec et doc chapitre 3, 134-186. L'œuf et les ovoproduit .Ed Lavoisier.

Corbo M.R., Lanciotti R., Gardini F. and Sinigaglia guerzoni M. E., 2000. Effects of Hexanal, trans-2-Hexanal and storage Temperature on Shelf Life of Fresh Sliced Apples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 2401-2408.

Cotelle N., Bernier J.L., Catteau J.P., Pommery J., Wallet J.C. and Gaydou E.M., 1996.Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radical Biology and Medecine*. **20**, 35 -43.

Cristiani M., D'arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro M.G. and Micieli D., 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 6300-6308.

Da Camara C.A.G., Akhtar Y., Isman M. B., Seffrin R. C., and Born F. S., 2015. Repellent activity of essential oils from two species of Citrus against *Tetranychus urticae* in the laboratory and greenhouse. *Crop Protection*, **74**, 110-115.

Davidson P.M., 1997. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: M. P. Doyle, L. R. Beuchat and T. J. Montville (eds.) ASM, Washington. *Food Microbiology*. 520-556.

De Pasquale F., Siragusa M., Abbate L., Tusa N., De Pasquale C., and Alonzo G., 2006. Characterization of five sour orange clones through molecular markers and leaf essential oils analysis. *Scientia Horticulturae*, **109**, 54–59.

De Pury P., 1968. Comment élever les poules éd. Clé, Yaoundé 229p.

De Reu K., Grijspeerdt K., Heyndrickx M., Uyttendaele M., Debevere J. and Herman L., 2006. Bacterial shell contamination in the egg collection chains of different housing systems for laying hens. *Brit. Poult. Sci.*, **47**, 163-172.

De Rocca Serra D., et Ollitrault P., 1992. L'amélioration des agrumes : les ressources génétiques, *Fruits*, **47**, 115-134.

De Souza P. M., and Fernandez A., 2011. Effects of UV-C on physicochemical quality attributes and *Salmonella enteritidis* inactivation in liquid egg products. *Food Control*, **22**, 1385–1392.

De Vaconcelos Silva M.G., Craveiro A.A., Abreu Matos F.J., Machado M.I.L., and Alencar J.W., 1999. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. *Fitoterapia*, **70**, 32-34.

Decker E. A., Warner K., Richards M. P., and Shahidi F., 2005. Measuring Antioxidant Effectiveness in Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**(10), 4303-4310.

Di Giacomo A., 1974. Gli oli essenziali degli agrumi. Essenza di Arancia amara. Essenza di Neroli Bigarade. Petit-grains. *Rivista Italiana Essenze, Profumi, Piante Officinali, Aromi, Saponi, Cosmetici, Aerosol*, **56**, 418-442.

Di Giacomo A., 1978. Huiles essentielles d'agrumes et fraudes : les méthodes de détection. Labo Pharma. Problèmes et Techniques, **277**, 508-514.

Di Pasqua R., Hoskins N., Betts G., and Mauriello G., 2006. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 2745-2749.

Djenane D., Yangüela J., Montañes L., Djerbal M. and Roncalés P., 2011(b). Antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* and *Satureja montana* essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media; efficacy and synergistic potential in minced beef. *Food Control*, **22**, 1046-1053.

Djenane D., Yangüela J., Derriche F., Bouarab L. et Roncalés P., 2012(c). Extrait de feuilles d'olivier; tests in vitro vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis et *Pseudomonas aeruginosa* ; application sur la viande de dinde. *Phytothérapie*, 10(1),10-18.

Djenane D., Meddahi A. et Roncales P.,2006. Les systèmes antioxydant et antimicrobien pour la conservation de la viande. *Sciences des Aliments*, **26**, 37-73.

Djenane D., Sánchez A., Beltrán J.A. and Roncalés P. (2003). Extension of the shelf life of beef steaks packaged in a modified atmosphere by treatment with rosemary and display under UV-free lighting. *Meat Science*. **64**, 417-426.

Djenane D., Yangüela Y., Gomez D., Roncales P., 2011(c). Perspectives on the use of essential oils as antibacterials against *Campylobacter jejuni* CECT7572 in retail chicken meats packaged in microaerobic atmosphere. *Journal of Food Safety*, **32**, 37-47

Djenane D., 2015. Chemical profile, antibacterial and antioxidant activity of Algerian citrus essential oils and their application in *Sardina pilchardus*. *Foods*, **4**, 208-228

Djenane D., Aïder M., Yangüela J., Idir L., Gómez D., and Roncalés P., 2012(a). Antioxidant and antibacterial effects of Lavandula and Mentha essential oils in minced beef inoculated with *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* during storage at abuse refrigeration temperature. *Meat Science*, **92**, 667-674.

Djenane D., Beltrán J. A., Camo J., and Roncalés P., 2016. Influence of vacuum ageing times of whole beef on retail shelf life of steaks packaged with oregano (*Origanum vulgare* L.) active film under high O₂. *Journal of Food Science and Technology*, **53**, 4244-4257.

Djenane D., Lefsih K., Yangüela J., and Roncalés P. 2012(b). Composition chimique et activité anti-*Salmonella* Enteritidis CECT 4300 des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*, *Lavandula angustifolia* et *Satureja hortensis*. Tests in vitro et efficacité sur les œufs entiers liquides conservés à 7 ± 1 °C. *Phytothérapie*. **9**(6), 343-353.

Djenane D., Meddahi A. and Roncalés P., 2006. Les systèmes antioxydants et antimicrobiens pour la préservation de la viande. *Sciences des Aliments*. **26** (1), 37-73.

Djenane D., Sánchez A., Beltrán J.A. and Roncalés, P. 2002. Ability of α-tocopherol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C, to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere. *Food Chemistry*. **76**, 407-415.

Djenane D., Sánchez A., Beltrán, J.A. and Roncalés P. 2001. Extension of the retail display life of fresh beef packaged in modified atmosphere by varying lighting conditions. *Journal of Food Science*. **66** (1), 181-185.

Djenane D., Yangüela J., Amrouche T., Boubrit S., Boussad N. and Roncalés, P. 2011(a). Chemical Composition and Antimicrobial Effects of Essential Oils of *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* Against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in Minced Beef. *Food Science and Technologie International*. **17**(6), 505-515.

Djenane D., Yangüela J., Roncalés P. and Aider M., 2013. Use of Essential Oils as Natural Food Preservatives: Effect on the Growth of *Salmonella* Enteritidis in Liquid Whole Eggs Stored Under Abuse Refrigerated Conditions. *Journal of Food Research*. **2** (3), 65-78.

Dongmo P.M.J., Tchoumboungang F., Ndongson B., Agwanande W., Sandjon B., Zollo P.H.A. and Menut C., 2010. Chemical characterization, antiradical, antioxidant and anti-inflammatory potential of the essential oils of *Canarium schweinfurthii* and *Aucoumea klaineana* (Burseraceae) growing in Cameroon. *Agric. Biol. J. N. Am.*, **1** (4), 606-611.

Druesne A., 1996(a). Le stress bactérien ; conséquences sur l'efficacité des traitements thermiques. 1ère partie : système d'adaptation des microorganismes. *Bull. Liaison CTSCCV*, 6(1), 3-6.

Druesne A., 1996(b). Le stress bactérien ; conséquences sur l'efficacité des traitements thermiques. 2ème partie : le stress bactérien. *Bull. Liaison CTSCCV*, 6(2), 71 -81.

Dubois-Brissonnet F., Dietrich C., Nicolas A., et Bellon-Fontaine M.N., 2008. Inactivation de Salmonella Typhimurium à l'état planctonique, adhérent ou en biofilm par des composés phénoliques extraits de plantes aromatiques. 3ème s Journées Thématiques Biofilms : approches expérimentales et moléculaires ,24-25 juin .Dourdan.

Dugo G., and Di Giacomo A., 2002. The genus Citrus, Taylor & Francis Publishing, London. 638 p.

Dung N.X., Pha N.M., Thien N.H., and Leclercq P.A., 1996. Chemical Investigation of the fruit peel oil of *Citrus medica* L. var. sarcodectylis (Noot.) Swingle from Vietnam, *J.Essent.Oil Res.*, 8, 15-18.

Erler F., Ulug I., and Yalcinkaya B., 2006. Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*, *Fitoterapia*, 77, 491-494.

Espina L., Gelaw T. K., De Lamo-Castellví S., Pagán R., and García-Gonzalo D., 2013. Mechanism of bacterial inactivation by (+)-Limonene and its potential use in food preservation combined processes. *PLoS One*, 8, 56769.

Espina L., Somolinos M., Lorán S., Conchello P., García D., and Pagán R., 2011. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, 22, 896-902.

European Pharmacopeia 2002. 4th ed. 2.8.12, 183e184. Council of Europe, Strasbourg Cedex.

F.D.A., 2005. GRAS notifications. Available from www.fda.gov. Accessed 13.12.05.

Fancello F., Petretto G. L., Zara S., Sanna M. L., Addis R., Maldini M., Foddai M., Rourke J. P., Chessa M., Pintore G., 2016. Chemical characterization, antioxidant capacity and antimicrobial activity against food related microorganisms of *Citrus limon* var. pompia leaf essential oil. *LWT-Food Science and Technology*, **69**, 579-585.

FAO. FAOSTAT, 2015. Food and Agriculture Organization of the United Nations STATISTICS DIVISION faostat3.fao.org/home/E. Last accessed 19.01.16.

FAOSTAT, 2013. Retrieved September 15, 2014, from. <http://faostat3.fao.org/>

Farhat A., Fabiano-Tixier A.-S., Maataoui M.E., Maingonnat J.-F., Romdhane M., and Chemat F., 2011. Microwave steam diffusion for extraction of essential oil from orange peel: kinetic data, extract's global yield and mechanism. *Food Chemistry*, **125**, 255 - 261.

Favier A., 2006. Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr. (64)*, 390-396.

FDA. Revised 2011. GRAS — essential oils, oleoresins (solvent-free), and natural extractives (including distillates), vol. 21CFR182.20.

Federman C., Joo J., Almario J. A., Salaheen S., and Biswas D., 2016. Citrus-derived oil inhibits *Staphylococcus aureus* growth and alters its interactions with bovine mammary cells. *Journal of Dairy Science*, **99**, 3667-3674.

Ferhat M. A., Meklati B. Y., Smadja J., and Chemat F., 2006. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils orange peel. *Journal of Chromatography A*, **1112**, 121-126.

Fernandez-Lopez J., Zhi N., Aleson-Carbonell L., Perez- Alvarez J. A., and Kuri V., 2005. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*, **69**(3), 371-380.

Fisher K., and Phillips C., 2009. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science & Technology*, **19**, 156-164.

Fisher K., Rowe C. and Phillips C., 2007. The survival of three strains of *Acrobacter butzleri* in the presence of lemon orange and bergamot essential oils and their components *in vitro* and food. *Letters in Applied Microbiology*, **44**, 495-499.

Fleisher Z., and Fleisher A., 1991. The Essential Oil of Ethrog (*Citrus medica* L. var. ethrog Engl). Aromatic Plants of the Holy Land and Sinai, part VI, *J. Essent. Oil Res.*, **3**, 377-379.

Folch J., Lees M., and Stanley G.H.S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, **226**, 497-509.

Fouk J. A., Akin D. E., and Dodd R. B., 2002. Trends in New Crops and New Uses. Alexandria : ASHS Press, 361p.

Friedly E. C., Crandall P. G., Ricke S. C., Roman M., O'Bryan C., and Chalova V. I., 2009. In vitro antilisterial effects of citrus oil fractions in combination with organic acids. *Journal of Food Science*, **74**, M67-M72.

Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. and Rasooli I., 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem.*, **102**, 898-904.

Galet O., Cassin D., et Jeantet R., 2010. Les ovoproduits, dans Science et technologie de l'œuf de l'œuf aux ovoproduits, ed tec et doc Lavoisier, Volume 2, chapitre 3, 223-274.

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

Garcia-Gonzalez L., Geeraerd A. H., Elst K., Ginneken V., Van Impe J. F., and Devlieghere F., 2009. Inactivation of naturally occurring microorganisms in liquid whole egg using high pressure carbon dioxide processing as an alternative to heat pasteurization. *Journal of Supercritical Fluids*, **51**, 74-82.

Gast R.K., Guard-bouldin J., and Holt P.S., 2005b. The relationship between the duration of fecal shedding and the production of contaminated eggs by laying hens

infected with strains of salmonella enteritidis and Salmonella heidelberg. *Avian Diseases*. **49**, 382-386.

Gast R.K., Guraya R., Guard-Bouldin J. and Holt P.S., 2007. *In vitro* penetration of egg yolks by *Salmonella Enteritidis* and *Salmonella Heidelberg* strains during thirtysix-hour ambient temperature storage. *Poult. Sci.*, **86**, 1431-1435.

Gast R.K., Holt P.S., and Murase T., 2005(a). Penetration of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella heidelberg* into egg yolks in an *in vitro* contamination model. *Poult Sci.* Apr, **84**(4), 621-5.

Gittins J.E., and Overfield N.D., 1991. The nutrient content of eggs in great Britain. In proceeding of the 4th European Symposium on the Quality of eggs and egg products, Oosterwod A., de Vries A.W. eds, Beekbergen, Netherland, 113-116.

Golmakani M. T., and Moayyedi M., 2015. Comparison of heat and mass transfer of different microwave-assisted extraction methods of essential oil from Citrus limon (Lisbon variety) peel. *Food Science & Nutrition*, **3**, 506 - 518.

Golmakani M. T., and Rezaei K., 2008(a). Microwave-assisted hydrodistillation of essential oil from *Zataria multiflora* Boiss. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **110**, 448-454.

Golmakani M. T., and Rezaei K., 2008(b). Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L. *Food Chemistry*, **109**, 925-930.

Goris A., 1967. Manuel de Botanique. Edition Clin, 265-268.

Goris A.L., Liot A., Janot M.M., et Goris A., 1949. Pharmacie galénique. Masson et Cie éd., Paris.

Goudable J., et Favier A., 1997. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **11**, 115-120.

Gounot A. M., 1991. Bacterial life at low temperature; physiological aspects and biotechnological implications. *J. Applied Bacteriol*, **71**, 386-397.

Granum P. E. A., Andersson A. Gayther C., Te Giffel M., Larsen H., Lund T., and O'Sullivan K., 1996. Evidence for a further enterotoxin complex produced by *B. cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **141**, 145-149.

Guillier L. Nazer A I, Dubois-Brissonnet F., 2007. Growth response of *Salmonella typhimurium* in the presence of natural and synthetic antimicrobials: estimation of MICs from three different models. *J Food Prot.* **70** (10), 2243-2250.

Guimaraes R., Barros L., Barreira J.C.M., Sousa M. J., Carvalho A.M. and Ferreira I.C.F.R., 2010 : Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. *Food Chem. Toxicol.*, 99 -106.

Guiraut J. P., 2003. Microbiologie alimentaire. Ed. DUNOD, Paris. pp. 110-112

Hammer K. A., and Carson C. F., 2011. Antibacterial and Antifungal Activities of Essential Oils in Thormar H. *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*. Ed. John Wiley & Sons, Ltd, United Kingdom. pp. 255 - 295.

Hammershøj M. et Johansen N.F., 2016. The effect of grass and herbs in organic egg production on egg fatty acid composition, egg yolk colour and sensory properties. *Livestock Science*, **194**, 37-43.

Hendrix C.M. et Redd J.B., 1995 : Chemistry and Technology of Citrus Juices and By- Products. In : Ashurst, P.R., 1995 : Production and Packaging of Non-Carbonated Juices and Fruit Beverages. Edition Blackie Academic & Professional, pp: 53-87.

Hosni K., Hassen I., M'Rabet Y., Sebei H., and Casabianca H., 2013. Genetic relationships between some Tunisian Citrus species based on their leaf volatile oil constituents. *Biochemical Systematics and Ecology*, **50**, 65-71.

Hosni K., Zahed N., Chrif R., Abid I., Medfei W., Kallel M., Ben Brahim N., and Sebei H., 2010. Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: evidence for the genotypic influence. *Food Chemistry*, **123**, 1098-1104.

ICMSF.,1986. International commission on microbiological specifications for foods. In *Microorganisms in foods. Sampling for microbiological Analysis: Principles and scientific applications* (Vol. 2) Toronto, Canada. ICMSF: University of Toronto Press.

ITAVI., 2015. Note de conjoncture. Situation de la production et des marchés des œufs et des produits d'œufs.

Jaset-dongmo P.M., Tatsadjieu N.L., Tchinda sonwa E., Kuate J., Amvam zollo P.H. and Menut C., 2008. Antiradical potentiel and antifungal activities of essential oils of the leaves of *Eucalyptus saligna* and *E. camaldulensis* against *Phaeoramularia angolensis*. *African Journal of Biotechnology*, **7**, 4045-4050.

Jean F.I., Collin G.J., et Lord D., 1992. Huiles essentielles et extraits micro-ondes. *Parfumer & Flavorist*, **17**, 35-41.

Jin Y., Yang N., Duan X., Wu F., Tong Q., and Xu X., 2015. Determining total solids and fat content of liquid whole egg products via measurement of electrical parameters based on the transformer properties. *Biosystems Engineering*, **129**, 70 -77.

Jukie, M. and Milos, M., 2005: Catalytic Oxidation and Antioxidant Properties of Thyme Essential Oils (*Thymus vulgarae* L.). *Croatia Chemica Acta*, N°. 1, (78), pp.105-110.

Jumenter I., 1984. Les huiles essentielles des citrus et leur utilisation en parfumerie. Thèse de Doctorat d'État, Université de Limoges, France.

Junior M.R.M., Rocha e-Silva T.A.A., Franchi G.C., Nowill A., Pastore G.M., and Hyslop S., 2009. Antioxidant potential of aroma compounds obtained by limonene biotransformation of orange essential oil. *Food Chemistry*, **116**, 8-12.

Juven B.J., Kanner J., Schved F., and Weisslowicz H., 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J Appl Microbiol*, **76**, 626–631.

Kamal G.M., Anwar F., Hussain A.I., Sarri N., and Ashraf Y.M., 2011. Yield and chemical composition of Citrus essential oils as affected by drying pretreatment of peels. *International Food Research Journal*, **18**, 1275-1282.

Kansci G., Genot C. and Gandemer G., 1994. Evaluation of antioxydant effect of carnosine on phospholipids by oxygen uptake and TBA test. *Sciences des Aliments*, **14**(5), 663-671.

- Kimball D.A., 1999.** Citrus processing : A complete guide. Second edition, Aspen Publication inc. 435 p.
- Kirbaslar F. G., Dulger B., Turker G., and Tavman A., 2012.** Antimicrobial activity of Turkish citrus leaf oils and compositions of Turkish orange and grapefruit leaf oils. *Analytical Chemistry Letters*, **2**, 72-79.
- Koedam A., Margaris N., and Vokou D., 1982.** Aromatic plants: Basic and Applied Aspects. Martinus Nijhoff publishers, The Hague.
- Lagha-Benamrouche S. and Madani K., 2013.** Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Ind. Crops Prod.* **50**, 723–730.
- Lakhdar L., Hmamouchi M., Rida S., and Ennibi O., 2012 .**Antibacterial activity of essential oils against periodontal pathogens: A qualitative systematic review. *Odontostomatol Trop. Dec.* **35**(140), 38-46.
- Larpent J. P., 1995.** *Listeria*, 140 pages, Lavoisier Editeur, Paris.
- Laruelle R., 1993.** Un vent de fleurs dans l'art du parfum. Paris, *le temps apprivoisé*, 105-125.
- Lee C. Y., Sharma A., Cheong J. E. and Nelson J. L., 2009.** Synthesis and antioxidant properties of dendritic polyphenols. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 6326-6330.
- Leyral G., et Vierling E., 1997.** Microbiologie et toxicologie des aliments. Editions Doin, p 54,55,81,82.
- Lopes D., Raga A.C., Stuart G.B., and Oliveira J.V., 2003.** Influence of vacuum distillation parameters on the chemical compositions of a five-fold sweet orange oil (*Citrus sinensis* Osbeck). *Journal of Essential Oil Research*, **15**, 408-411.
- Lota M.R.,1999.** Les huiles essentielles d'agrumes: caractérisation par RMN du carbone-13 CPG-IK et CPG/SM. Thèse de Doctorat d'État, Université de Corse-Pascal Paoli, (France).
- Lucchesi M. E., 2005.** Thèse de Doctorat, Université de La Réunion, France.

Lucchesi M. E., Chemat F., Smadja J. 2004(b). An original solvent free microwave extraction of essential oil from spices. *Flav. Fragr J.*, **19**, 134-138.

Lucchesi M. E., Chemat F., Smadja J., 2004(a). Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromatogr A*, **1043**, 323-327.

Luciardi M. C., Blázquez M. A., Cartagena E., Bardón A., and Arena M. E., 2016. Mandarin essential oils inhibit quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *LWT-Food Science and Technology*, **68**, 373-380.

Magina M.D.A., Dalmarco E.M., Wisniewski A., Simionatto E.L., Dalmarco J.B., Mejlholm O. and Dalgaard P., 2009. Antimicrobial effect of essential oils on sea food spoilage microorganism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish. *Letters in Applied Microbiology*, **34**, 27-31.

Mahieu H., 1984, Modifications du lait après récolte. In : Les laits, de la mamelle à la laiterie, 397 pages, Lavoisier Editeur, Paris.

Martin A., 2001. Apports Nutritionnels Conseillés pour la population française, 3th edition, pp 605. Tec and Doc, Lavoisier ed., Paris, Londres, New York.

Mechergui K., Jaouadi W., Coelho José P., Serra M. C., Marques A. V., Palavra A. M.F., Khouja M.A. and Boukhchina S., 2014. Chemical composition and antioxidant activity of Tunisian *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and volatile oil obtain by supercritical CO₂ extraction. *International Journal of Advanced Research*, **12(2)**, 337-343.

Mengal P., Behn D., Bellido GIL M., et Monpon B. 1993. VMHD : extraction d'huile essentielle par micro-ondes. *Parfums, Cosmétiques, Arômes*, **114**, 66-67.

Mengal P., et Monpon B., 1994. Procédé et installation d'extraction sans solvant de produits naturels par micro-ondes. *Brevet international*, WO 94/26853.

Messens W., Grijspeerdt K. and Herman L., 2005. Eggshell characteristics and penetration by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis through the production period of a layer flock. *British Poultry Science* Volume 46, Number 6 (Decembre), pp. 694-700

Metaxas A.C., and Meredith R.J., 1983. Industrial Microwave Heating. Peter Peregrinus Ltd., London.

Meyer. B., and Warnod., 1984. Natural essential oils: extraction processes and applications to some major oils. *Perfumer & Flavorist*, **9**, 93-103.

Miguel M.G., 2010.Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: *A Short Review*’, *Molecules*, Vol. 15(12), 9252 - 9287.

Mimica-duki N. C., 2003.Aromatic Plants as Dietary Supplements in Human Health, *La phytothérapie Européenne*, N°14, pp. 13 - 18.

Minh Tu N.T., Thanh L.X., Une A., Ukeda H., and Sawamura M., 2002. Volatile constituents of Vietnamese pummelo, orange, tangerine and lime peel oils. *Flavour Fragr. J.* **17**, 169-174.

Moleyar V. and Narasimham P., 1986. Antifungal activity of some essential oil components, *Food Microbiology*, **3**, 331-336.

Monfort S., Mañas P., Condón S., Raso J., and Álvarez I.,2012. Physicochemical and functional properties of liquid whole egg treated by the application of pulsed electric fields followed by heat in the presence of triethyl citrate. *Food Research International*, **48**, 484-490.

Muthaiyan A., Martin E. M., Natesan S., Crandall P. G., Wilkinson B. J., and Ricke S. C., 2012. Antimicrobial effect and mode of action of terpeneless cold pressed Valencia orange essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cell lysis. *Journal of Applied Microbiology*, **112**, 1020-1033.

Nannapaneni R., Chalova V. I., Crandall P. G., Ricke S. C., Johnson M. G., and O'Bryan C. A., 2009. Campylobacter and Arcobacter species sensitivity to commercial orange oil fractions. *International Journal of Food Microbiology*, **129**, 43-49.

Nau F., Anton M. et Nys Y., 2003. L'œuf de poule : une mine de molécules a activités biologiques. Cinquièmes journées de la recherche avicole, Tours ,26 et 27 mars.

Nau F., Flourya F., Hayo Van Der Werf H., V., D., et Le Minousc A., E., 2016. Les œufs et les ovoproduits dans l'alimentation des Français. Cahiers de nutrition et de diététique CND-317 ; Pages 10. in presse.

Nau F., Nys Y., Yamakawa Y., et Réhault-godbert S., 2010. Intérêt nutritionnel de l'œuf en alimentation humaine. In : Numéro Spécial, Qualité de l'œuf. Nys Y. (Ed). Inra Prod. Anim., **23**, 225-236.

Nazer A.I. Kobilinsky A. Tholozan J.L., and Dubois-Brissonnet Florence F., 2005. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect ? *Food Microbiology*, **22** (5).

Nys Y., et Sauveur B., 2004. Valeur nutritionnelle des œufs. *Productions Animales*, INRA. . 17(5), 385-393.

O'Bryan C. A., Crandall P. G., Chalova V. I., and Ricke S. C., 2008. Orange essential oils antimicrobial activities against *Salmonella* spp. *Journal of Food Science*, **73**, M264-M267.

Ohkawa H., Ohishi N., and Yagi K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues. *Analytical Biochem*, **95**, 351–358.

Okamura M., Miyamoto T., Kamijima Y., Tani H. and Sasai K., 2001. Differences in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in intravaginally inoculated hens and *in vitro* adherences to vaginal explants between *Salmonella* *Enteritidis* and other *Salmonella* serovars. *Avian Dis.*, **45**, 962-971.

Okoh O.O., Sadimenko A.P. and Afolayan A.J., 2010. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chemistry*, **120**, 308-312.

Olmedo R.H., Nepote V., and Grosso N.R., 2012. Aguaribay and Cedron Essential Oils as Natural Antioxidants in Oil-Roasted and Salted Peanuts', *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **89**(12), pp. 2195 - 2205.

Omidbeygi M., Barzegar M., Hamidi Z. and Naghdibadi H., 2007. Antifungal activity of tyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus xavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*, **18**, 1518-1523.

Oussalah M., Caillet S., Saucier L. and Lacroix M., 2006. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, **69** (5), 1046-1055.

Padrini F. et Lucheroni M. T., 1996. Le grand livre des huiles essentielles - guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et L'aromassage Energétiques avec Plus de 100 Photographies. Ed. De Vecchi , Paris, 11-15.

Packer L., Kraemer K. and Rimbach G., 2001. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*, **17**(10), 888-895.

Paré J.R.J., 1994. Microwave extraction of volatile oils. *Brevet américain*, US 5 338 557.

Paré J.R.J., and Bélanger J.M.R., 1997. Instrumental methods in food analysis. Elsevier, Amsterdam.

Paré J.R.J., Sigouin M., and Lapointe., 1991. Microwave assisted natural product extraction. *Brevet américain*, US 5 002 784.

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

Parfums, Cosmétiques et Arômes. 16.

Parisi M. A., Northcutt J. K., Smith D. P., Steinberg E. L., and Dawson P.L., 2015. Microbiological contamination of shell eggs produced in conventional and free-range housing systems. *Food Control*, **47**, 161-165.

Pattnaik S., 1995. Effect of essential oils in the variability and morphology of *Escherichia coli*. *Microbios.*, **48**, 195-9

Payne J., Gooch J. E. T., and Barnes E. M., 1979. Heat-resistant bacteria in pasteurized egg products. *Poultry Sci.*, **49**, 578-585

Pendleton S. J., Crandall P. G., Ricke S. C., Goodridge L., and O'Bryan C. A., 2012. Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from beef by cold pressed terpeneless Valencia orange oil at various temperatures. *Journal of Food Science*, **77**, M308-M311.

Perino-Issartier S., Ginies C., Cravotto G., and Chemat F., 2013. A comparison of essential oils obtained from lavender via different extraction processes: ultrasound, microwave, turbohydrodistillation, steam and hydrodistillation. *Journal of Chromatography A*, **1305**, 41-47.

PhysChem, 2004. Boiling Point Calculator 7.0. Advanced Chemistry Development, Toronto.

Pibiri P., 2005. Assainissement microbiologique de l'air et de systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat : Faculté Environnement Naturel, Architectural et Construit, EPFL (Suisse). 161p.

Pittman C. I., Pendleton S., Bisha B., O'Bryan C., Goodridge L., and Crandall P. G., et al., 2011. Validation of the use of citrus essential oils as a post-harvest intervention against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. on beef primal cuts. *Journal of Food Science*, **76**, M433-M438.

Praloran J.C., 1971. Les agrumes, Maisonneuve G. P et Larose, Paris.

Prudent D., Perineau F., Bessiere J.M., Michel G.M. and Baccou J.C., 1995. Analysis of the essential oil of *Origanum vulgare* L. evaluation of its bacteriostatic and fungistatic properties. *Journal of Essential Oil Research*, **7**, 165-173.

Rafi A., 1994. Tasneem U S., Achfaq A., Muchtaq A. Medicinal importance of essential oils. *Hamdard Medicus*. XXXVI (3): 101-105.

Ragni L., Berardinelli A., Cevoli C., and Sirri F., 2011. Admittance measurements to assess the total solids and fat contents in liquid whole egg products. *Journal of Food Engineering*, **107**, 179–185.

Rasooli I., Fakoor M.H., Yadegarinia D., Gachkar L., Allameh A. and Rezaei M.B., 2008. Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *Food Chemistry*, 135-140.

Recueil des normes françaises, 2000. Huiles essentielles. Editions AFNOR, Paris,.

Règlement 2073/2005/CE. Le 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. JOL 338/1 du 22.12.2005

Robert A. et Lobstein A., 2005. Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments *et* huiles essentielles. Ed : Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 522 p.

Rossi M., Casiraghi E., Primavesi L., Pompei C., and Hidalgo A., 2010. Functional properties of pasteurised liquid whole egg products as affected by the hygienic quality of the raw eggs. *LWT-Food Science and Technology*, **43**, 436–441

Roussy G., et Pearce J.A., 1995. Foundations and Industrial Applications of Microwaves and Radio Frequency Fields. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.

Rozier F., 1995. H.A.C.C.P., de la théorie à quelques contraintes, 80 pages, La Cuisine Collective Editeur, Paris.

Ruiz B., and Flotats X., 2014. Citrus essential oils and their influence on the anaerobic digestion process: an overview. *Waste Management*, **34**, 2063e2079.

Sahraoui N., Vian M. A., Bornard I., Boutekedjiret C., and Chemat F., 2008. Improved microwave steam distillation apparatus for isolation of essential oils: comparison with conventional steam distillation. *Journal of Chromatography A*, **1210**, 229-233.

Sahraoui N., Vian, M. A., El Maataoui M., Boutekedjiret C., Chemat F., 2011. Valorization of citrus by-products using Microwave Steam Distillation (MSD). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **12**, 163-170.

Sánchez-Escalante A., Torrescano G., Djenane D., Beltrán J.A., Giménez B. and Roncalés P. (2011). Effect of antioxidants and lighting conditions on color and lipid stability of beef patties packaged in high-oxygen modified atmosphere. *CyTA Journal of Food*. **9** (1), 49-57.

Sanchez-Moreno C., 2002. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Food Science and Technology*, **8**, 121-137.

Sauveur B., 1988. Structure, composition et valeur nutritionnelle de l'œuf, dans reproduction des volailles et production d'œufs, ed .INRA, Paris 449 p, chapitre **14**, 347-436. Reproduction des volailles et production d'œufs.

Schelz S., Hohmann J., and Molnar J., 2010. Recent advances in research of antimicrobial effects of essential oils and plant derived compounds on bacteria. *Ethnomedicine: A Source of Complementary Therapeutics* , pp. 179-201 ISBN: 978-81-308-0390-6 .

Scherer R., and Godoy H.T., 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl- 1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, **112**, 654-658.

Scora R. W., and Newman J. E., 1967. A phonological study of the essential oils of the peel of Valencia oranges. *Agricultural Meteorology*, **4**, 11-26.

Scora R.W., 1988. Biochemistry, Taxonomy and Evolution of Modern Cultivated Citrus, Proc. Sixth Int. Citrus Congress, **1**, 277-289.

Sefidkon F., Abbasi K., Jamzad Z., and Ahmadi S., 2007. The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. *Food Chemistry*, **100**, 1054-1058.

Settanni L., Palazzolo E., Guarrasi V., Aleo A., Mammina C., Moschetti G., and Germanà M. A., 2012. Inhibition of foodborne pathogen bacteria by essential oils extracted from citrus fruits cultivated in Sicily. *Food Control*, **26**, 326-330.

Seuss-Baum I., 2007. Nutritional evaluation of egg compounds. In: Bioactive egg compounds.

Shahidi F., and Zhong Y., 2005. Lipid oxidation: measurement methods. Vol.(1). New Jersey: bailey's industrial oil and fat products.

Sharma N. and Tripathi A.,2006. Fungitoxicity of *Citrus sinensis* L. essential oil on post-harvest pathogens. *World Journal of Microbiological and Biotechnology*, **22**, 587-593.

Sharma N., and Tripathi A., 2008. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research*, **163**, 337-344.

Shiota H., 1990. Volatile components in the Peel Oil from Fingered Citron (*Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* Swingle, *Flav. Fragr. J.* **5**, 33-37.

Siddique S., Nawaz S., Perveen Z., Khan R.A., Khanum R., and Shahzad K., 2012. Volatile components and antimicrobial activity of *Citrus sinensis* var. *mosammi* leaf oil. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, **11**, 172-179.

Silvetti T., Morandi S., Hintersteiner M., and Brasca M., 2017. Use of hen egg white lysozyme in the food industry. Book Chapter. Egg Innovations and Strategies for Improvements. Pp 233-242. DOI: 10.1016/B978-0-12-800879-9.00022-6 . *Elsevier Inc*

Singh P., Shukla R., Prakash B., Kumar A., Singh S., Mishra P. K., Dubey N. K., 2010. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 1734–1740.

Sirsat S. A., Muthaiyan A., and Ricke S. C., 2009. Antimicrobials for foodborne pathogen reduction in organic and natural poultry production. *Journal of Applied Poultry Research*, **18**, 379e388.

Smith-Palmer A., Stewart J., and Fyfe L., 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, **26**, 118e122.

Soliman K.M. and Badeaa R.I., 2002.Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi, *Food Chem. Toxicol.*, **40**, 1669-1675.

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

Stashenko E.E., Jaramillo B.E., Martinez J.R., 2004(a). Analysis of volatil secondary metabolites from Colombian *Xylopia aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography. *J. Chromatogr A*, **1025**,105-113.

Stashenko E.E., Jaramillo B.E., Martinez J.R., 2004b. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *J.Chromatogr A.*, **1025**, 93-103.

Stefanovits-Bányai É., Tulok M.H., Hegedûs A., Renner C. and Varga I.S., 2003. Antioxidant effect of various rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) clones. *Acta Biologica Szegediensis*, **47**, 111-113.

Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A. F., Glazer, A. N. and Ames, B. N., 1987. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, **235** (4792), 1043-1046.

Su H. P., and Lin C. W., 1993. A new process for preparing transparent alkalised duck egg and its quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **61**(1), 117–120.

Sun J., 2007. D-Limonene: Safety and clinical applications. *Altern. Med. Rev.*, **12** (3), 259. microbials for drug Discovery, Evid. Based Complement. *Alternat. Med.* **7**, 283-294.

Surk K.I. and Nielsen P.V., 2003.Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal Applied Microbiology*, **99**, 665-674.

Swingle W.T., and Reece P.C., 1967. The botany of Citrus and relatives in “ The Citrus Industry “, Univ. of California, Berkeley, W.Reuther, L.D. Batchelor and H.J. Webber, Editors, **1**, 190-430.

Tanaka T., 1961. Citologia : Semi Centennial Commemoration Papers on Citrus Studies, Citologia supporting fondation, Osaka, Japan, 114.

Tang G.W., Yang C.J., and Xie L.D., 2007. Extraction of *Trigonella foenum-gracum* L. by supercritical fluid CO₂ and its contact toxicity to *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae), *J. Pest. Sci.*, **80**, 151-157.

Teles S., Pereira J.A., Santos C.H.B., Menezes R. V., Malheiro R., Lucchese A.M., and Silva F., 2013. Effect of geographical origin on the essential oil content and composition of fresh and dried *Mentha*×*villosa* Hudson leaves. *Industrial Crops and Products*, **46**, 1-7.

Thi N.D.T., Anh T.H. and Thach L.N., 2008.The essential oil composition of *Eryngium foetidum* L. in South Vietnam extracted by hydrodistillation under conventional heating and microwave irradiation. *Journal of essential oil bearing plants*, **11**, 154-161.

Toursel P., 1997. Extraction high-tech pour notes fraîches. *Process*, **1128**, 38-41.

Trouillas P., Calliste C.A., Allais D.P., Simon A., Marfak A., delage C. and Jean-Luc Duroux J.L., 2003. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chemistry*.(80),3, 399-40.

Trovato G., 1978. L'essence de citron et hespéridées de Sicile. *Parfums, Cosmétiques, Arômes*. **21**, 71-77.

Vansant G. (2004). Radicaux libres et antioxydants. Principe de base. *Symposium « antioxydant et alimentation »*. institut DANONE.

Vekiari S. A., Protopapadakis E. E., Papadopoulou P., Papanicolaou D., Panou C., and Vamvakias M., 2002. Composition and seasonal variation of the essential oil

from leaves and peel of a Cretan Lemon Variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 147–153.

Viuda-Martos M., Ruiz Navajas Y., Sánchez Zapata E., Fernández-López J., and Pérez-Álvarez J.A., 2009. Antioxidant Activity of Essential Oils of Five Spice Plants Widely Used in a Mediterranean Diet, *Flavour and Fragrance Journal*, **25**(1), 13 - 19.

Viuda-Martos M., Mohamady M. A., Fernández-López J., Abd ElRazik K. A., Omer E. A., Pérez-Alvarez J. A., and Sendra E., 2011. *In vitro* antioxidant and antibacterial activities of essentials oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food Control*, **22**, 1715-1722.

Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernández-López J., and Pérez-Álvarez J., 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*, **19**, 1130-1138.

Vuuren S. Fv., and Viljoen A. M., 2007. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. *Flavour and Fragrance Journal*, **22**, 540–544.

Wang B., Pace R. D., Dessai A. P., Bovell-Benjamin A., and Phillips B., 2002. Modified Extraction Method for Determining 2-Thiobarbituric Acid Values in Meat with Increased Specificity and Simplicity. *Journal of Food Science*, **67**(8), 2833-2836.

Wang J., Zhao J., Liu H., Zhou L., Liu Z., Wang J., Han J., Yu Z., and Yang F., 2010a. Chemical Analysis and Biological Activity of the Essential Oils of Two Valerianaceous Species from China: *Nardostachys chinensis* and *Valeriana officinalis*. *Molecules*, **15**, 6411-6422.

Wang H.F., Yih K.H. and Huang K.F., 2010b. Comparative study of the antioxidant activity of forty-five commonly used essential oils and their potential active components. *Journal of Food and Drug Analysis*, **1**(18), 24-33.

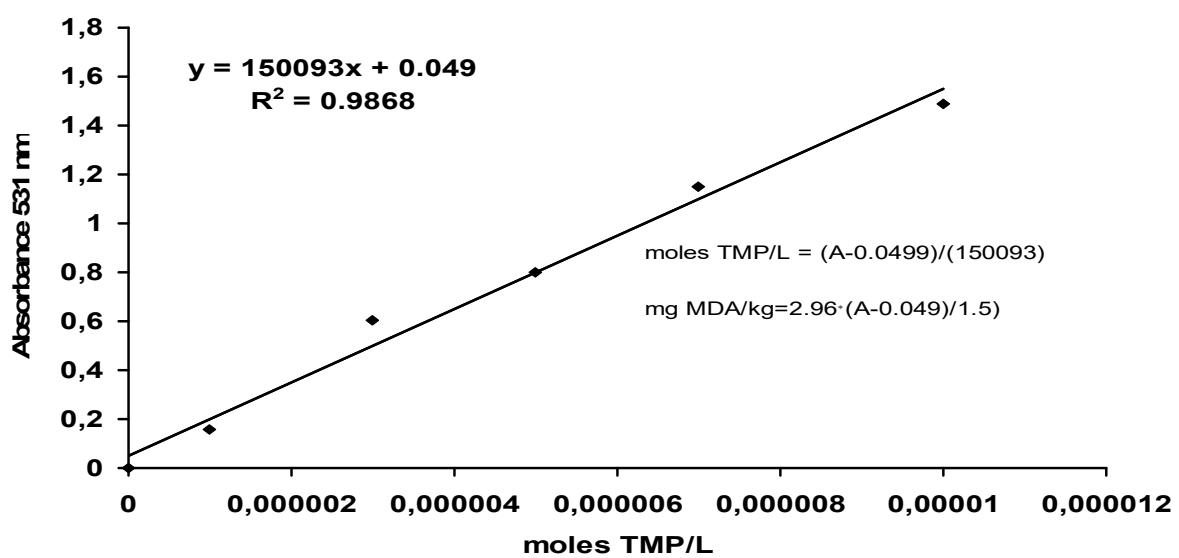
Watts B.M., Ylimaki G.L., Jeffery L.E., et Elias L.G., 1991. Méthodes de base pour l'évaluation sensorielle des aliments. Ed. Centre de recherches pour le développement international, Amérique, 145 p

Webber H.J., Reuther W., and Batchelor L.D., 1967. The citrus Industry, volume 1 : History, world distribution, botany and varieties. Edition. University of California Press.

Wei L., Zhang Y. and Boquan B., 2013. Comparison of Microwave-assisted Hydrodistillation with the Traditional Hydrodistillation Method in the Extraction of Essential Oils from Dwarfed Cinnamomum Camphora var. Linaolifera Fujita Leaves and Twigs. *Advance Journal of Food Science and Technology*, **5**(11): 1436-1442.

Zhang Z., Vriesekoop F., Yuan Q., and Liang H., 2014. Effects of nisin on the antimicrobial activity of D-limonene and its nanoemulsion. *Food Chemistry*, **150**, 307–312.

Annexe : Courbe d'étalonnage de TMP pour la détermination des teneurs totales en SR-TBA.



VALORISATION

Une partie des travaux relatés dans ce manuscrit de thèse a donné lieu à la publication d'un article scientifique dans des journaux internationaux à comité de lecture.

Publication scientifique dans une revue à comité de lecture

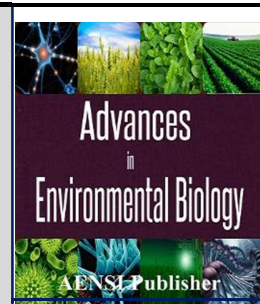
Advances in Environmental Biology, 11(3) March 2017, Pages: 38-43.



AENSI Journals

Advances in Environmental Biology

ISSN-1995-0756 EISSN-1998-1066

Journal home page: <http://www.aensiweb.com/AEB/>

Clean Production in Algeria. Solvent free microwave extraction of essential oils

¹Aboudaou Malek, ²Ferhat Mohamed Amine and ¹Hazzit Mohamed.

¹Département de Technologie des Industries Agricoles et Alimentaires, Institut National Agronomique (INA), 16200 El-Harrach, Alger, Algeria.

²Laboratory of Research on Bio-active Products and Valorization of Biomasse, Ecole Normale Supérieure, vieux-Kouba 16050, ENS BP 92 Kouba- Alger, Algeria.

Address For Correspondence:

Aboudaou Malek, Département de Technologie des Industries Agricoles et Alimentaires, Institut National Agronomique (INA), 16200 El-Harrach, Alger, Algeria.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Received 12 January 2016; Accepted 10 March 2017; Available online 26 March 2017

ABSTRACT

T

Background: One of the principal aims of Cleaner production (CP) remains the dissemination and teaching of clean chemistry to both Developed and developing nations. This paper describes one attempt to show that “north-south” collaborations yield innovative clean technologies which give major benefits for both nations. **Objective:** In this paper we present early results from a solvent free microwave extraction (SFME) of essential oils using fresh orange peel, a by-product in the production of orange juice in Algeria. **Results:** SFME is performed at atmospheric pressure without added any solvent or water. SFME increases essential oil yield and eliminate wastewater treatment. **Conclusion:** The procedure is appropriate for the teaching and research laboratory, and allows the students and researchers to learn extraction, chromatographic and spectroscopic analysis skills, and are expose to dramatic visual example of rapid and clean extraction of essential oil , and are introduced to commercially successful clean chemical processing with microwave.

KEYWORDS: Clean production, extraction microwave, essential oil, limonene, orange peel

INTRODUCTION

In general, an analytical procedure for essential oils or aromas from plants or spices comprises two steps: extraction (e.g. steam distillation, hydro-distillation and simultaneous distillation-extraction) and analysis (e.g. gas chromatography (GC) or gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) (Please added References). While the analysis step is complete after only 15 to 30 minutes, extraction takes at least several hours. It is frequently done by a prolonged heating and stirring in boiling water) (Please added References). The principal limiting step of the sample treatment is the extraction of essential oil from the matrix, which consists in transferring the compounds into boiling water followed by azeotropic distillation, condensation and physical separation)(Please added References). The essential oil is constituted not only of the compounds of interest at high concentration or trace levels but also of co-extracted compounds (e.g. water, endogenous compounds and other contaminants) which can interfere with the analysis)(Please added References). It is necessary to purify extracts, to re-concentrate or to dilute them. The analysis is performed by a fine separation coupled to a sensitive and selective detector, typically gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) (Please added References). The choice of the technique is the result of a compromise between efficiency and reproducibility of extraction, ease of procedure, together with considerations of cost, time, the degree of automation and safety. These shortcomings have led to the consideration of the use of new "clean" technique in essential oil extraction,

Which typically use less solvent and energy, such as supercritical fluid extraction [1], ultrasound extraction [2], subcritical water extraction [3], controlled pressure drop process [4], and microwave extraction [5].

Here we describe a fast solvent free microwave extraction, known as “SFME” or “DryDist”. Based on a relatively simple principle, this method involves placing plant material in a microwave reactor, without any added solvent or water. The internal heating of the *in situ* water within the plant material distends the plant cells and leads to rupture of the glands and oleiferous receptacles. This process thus frees essential oil which is evaporated by the *in situ* water of the plant material. A cooling system outside the microwave oven condensed the distillate continuously. The excess of water was refluxed to the extraction vessel in order to restore the *in situ* water to the plant material.

In this paper, the new laboratory procedure is summarized in the experimental section. In the results and discussion section, both the chemical and clean lessons of this process are discussed and extensions are proposed. Microwaves (MW) are electromagnetic waves with a frequency range from 100 MHz to 3 GHz. MWs comprise electric and magnetic field components and thus constitute propagating electromagnetic energy. This energy acts as a non-ionising radiation that causes molecular motions of ions and rotation of the dipoles, but does not affect molecular structure.

When dielectric materials containing either permanent or induced dipoles are placed in a microwave field, the rotation of the dipoles in the alternating field produces heat. More precisely, the applied microwave field causes the molecules, on average, to spend slightly more time orienting themselves in the direction of the electric field rather than in other directions. When the electric field is removed, thermal agitation returns the molecules to a disordered state in the relaxation time and thermal energy is released. Thus microwave heating results from the dissipation of the electromagnetic waves in the irradiated medium. The dissipated power in the medium depends on the complex permittivity of the material and the local time-averaged electric field strength. In conventional heating, heat is transferred from the heating medium to the interior of the sample, while in microwave heating, heat is dissipated volumetrically inside the irradiated medium. MW is volumetrically distributed heating, and heat transfers occur from the sample to the colder environment. This causes an important difference between conventional and microwave heating. In conventional heating, heat transfer depends on thermal conductivity, on the temperature difference across the sample, and, for fluids, on convection currents. As a result, the temperature increase is often rather slow. By contrast, in microwave heating, due to the volumetric heating effect, much faster temperature increases can be obtained, depending on the microwave power and the dielectric loss factor of the material being irradiated (Figure 1).

Although microwaves heat volumetrically, it is well known that the electromagnetic field distribution is not even in the irradiated material, thus the energy is not homogeneously dissipated. The electric field distribution depends on the geometry of the heated object and the dielectric properties. For media which readily absorb microwaves, i.e. for which the loss factor is > 5 , the penetration depth D_p at which the dissipated power is

reduced to 1/e of surface value might be a limiting factor $D_p \approx \frac{\lambda_0 \sqrt{\epsilon''}}{2\pi \epsilon''}$ Where λ_0 : wave length; ϵ'' : dielectric

Constant, ϵ'' : loss factor. If this dimension is much smaller than the dimension of the object being heated, localized surface heating will occur. For more transparent media, e.g. with a loss factor < 0.01 , penetration depth will not be problematical but dissipating enough power will. In addition, the occurrence of standing wave patterns will result in “hot spots” if the power dissipation is faster than the heat transfer to surrounding colder areas. As a rule of thumb; a standing wave pattern can occur if the characteristic dimension of the object is several half wave length larger than the wavelength of radiation in the material. Hot spots have been observed in poorly conductive materials (solids or highly viscous media) and at the surface of boiling liquids by IR measurements.

The advantages of using microwave energy, a non contact heat source, include faster energy absorption, reduced thermal gradients, and selective heating) (Please added References). For extraction of essential oils from plant materials, the benefits could include: more effective heating, fast heating, reduced equipment size, faster response to process heating control, faster start-up, increased production, and elimination of process steps)(Please added References).

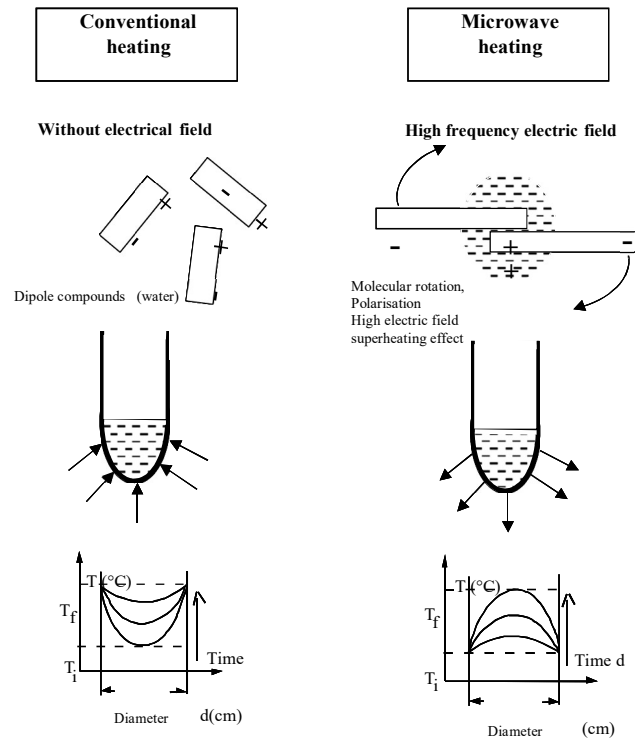


Fig. 1: Characteristics of the microwave heating

MATERIALS AND METHODS

SFME has been performed using the “DryDist” microwave oven illustrated in figure 2 [6]. In a typical MAD procedure performed at atmospheric pressure, 200 g of fresh orange peels were heated using a fixed power of 200 W for 10 minutes without added any solvent or water [7]. The extraction was continued at 100°C until no more essential oil was obtained. For comparison, 200 g of fresh orange peels were submitted to hydro-distillation with a Clevenger-type apparatus [8] according to the European Pharmacopoeia and extracted with 2 L of water for 3 hours (until no more essential oil was obtained). Another comparison has been made by cold Pressing apparatus and procedure. Essential oil is collected from 1 kg of whole orange fruit using an automated cold pressing machine from Schaub. The epidermis and oil glands were lacerated by a needle, creating areas of compression in the peel, surrounded by areas of lower pressure, across which the oil flows to the exterior. The oil is carried down to a decantation vessel in a stream of water, the emulsion being collected and then separated by centrifugation. The essential oil was collected, dried under anhydrous sodium sulphate and stored at 4°C until used.

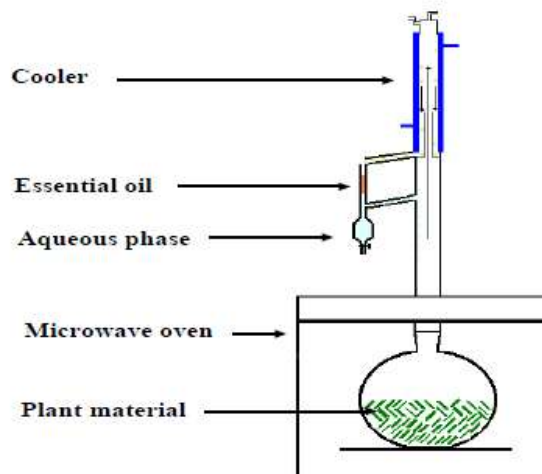


Fig. 2: Solvent-Free Microwave Extraction System

A Hewlett-Packard 6890 GC system was used for gas chromatography analysis, fitted with a fused-silica-capillary column with an apolar stationary phase HP5MSTM (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m film thickness). The column temperature progress from 60 to 280°C at 2°C min⁻¹. Injection was performed at 250°C in the splitless mode; 1 μ L of sample was injected. A flow rate of 0.3 ml/min carrier gas (N₂) was used. Flame ionisation detection was performed at 320°C. The essential oils were also analysed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) (Hewlett-Packard computerized system comprising a 6890 gas chromatograph coupled to a 5973A mass spectrometer) using the same column HP5MSTM. Identification of the components was achieved from their relative retention indices on HP5MSTM column, determined with reference to an homologous series of C₅-C₂₈ n-alkanes, and by a comparison of their mass spectral fragmentation patterns with those stored in the data bank (Wiley/NBS library) and the literature [9].

RESULTS AND DISCUSSION

Solvent free microwave extraction (SFME), as well as hydro-distillation (HD) and cold pressing (CP) as methods for the extraction of essential oil from orange peels, are compared in term of extraction time, quality of the oil, efficiency and costs. Table 1 lists the grouped compounds in essential oil: oxygenated and non-oxygenated fractions, and composition of chemical families of orange essential oils obtained by different extraction methods. The comparison of yields, extraction times, and detailed composition for each extract are also reported.

Table 1: Chemical compositions of essential oils obtained by SFME, HD, and CP extraction from orange peels.

N°	Compounds ^a	R.I. ^b	R.I. ^c	Valencia Late		
				SFME ^e	HD ^f	CP ^h
	Monoterpene Hydrocarbons			97.48	98.61	98.32
1	Thujene<Alpha->	920	1036	-	-	-
2	Pinene<Alpha->	926	1023	0.43	0.53	0.51
3	Sabinene	961	1121	0.54	0.49	0.54
4	Pinene<Beta->	974	1109	-	-	-
5	Myrcene<Beta->	988	1165	1.64	1.87	1.82
6	Phellandrene<Alpha->	1001	1177	0.15	0.17	0.36
7	Terpinene<Alpha->	1020	1083	-	-	-
8	Limonene	1030	1206	94.64	95.48	95.06
9	Ocimene<(E)-Beta->	1048	1282	0.02	0.02	0.02
10	Terpinene<Gamma->	1103	1285	0.05	0.03	0.01
11	Terpinolene	1120	1304	0.01	0.02	0.01
	Oxygenated Monoterpenes			1.09	0.58	0.55
12	Linalool	1125	1538	0.62	0.30	0.30
13	Citronellal	1167	1478	0.06	0.03	0.04
14	Terpin-4-ol	1191	1590	0.03	0.06	0.02
15	Terpineol<Alpha->	1203	1677	0.10	0.06	0.05
16	Nerol	1237	1781	0.10	0.03	0.08
17	Neral	1268	1670	0.05	0.03	0.06
18	Geraniol	1271	1828	0.04	0.01	-
19	Geranial	1284	1714	0.09	0.06	0.11
20	Thymol	1288	2107	-	-	-
	Sesquiterpene Hydrocarbons			0.06	0.10	0.15
21	Caryophellene<E->	1391	1594	0.02	0.02	0.01
22	Humulene<Alpha->	1450	1657	0.01	0.03	0.03
23	Germacrene D	1477	1696	-	-	-
24	Valencene	1488	1705	0.02	0.05	0.02
25	Bisabolene<Beta->	1508	1718	-	-	-
26	Oxygenated Sesquiterpenes			0.01	-	0.09
27	Elemol	1540	1381	0.01	-	0.09
28	Caryophellene Alcohol	1560	1398	-	-	-
29	Nootkatone	1799	2250	-	-	-
	Other Oxygenated Compounds			0.50	0.27	0.31
31	Octanol<N->	1102	1544	0.15	0.05	-
32	Nonanal<N->	1126	1400	0.01	0.01	0.02
33	Decanal	1210	1497	0.31	0.19	0.27
34	Linalyl acetate	1255	1553	-	-	-
35	Citronellyl Acetate	1342	1645	0.02	0.02	0.01
36	Neryl Acetate	1351	1706	0.01	-	0.01
37	Geranyl Acetate	1366	1742	-	-	-
38	Dodecanal	1391	1691	-	-	-
	Extraction time (min)			10	180	60
	Yield %			0.40	0.40	0.16
	Total Oxygenated Compounds %			1.60	0.82	0.95

	Total non-Oxygenated Compounds %			97.54	98.71	98.47
--	----------------------------------	--	--	-------	-------	-------

^a Essential oil compounds sorted by chemical families and percentages calculated by GC-FID on non-polar HP5MSTM capillary column.

^b Retention indices calculated on non-polar HP5MSTM capillary column.

^c Retention indices calculated on polar CarbowaxTM-PEG capillary column.

^e SFME : solvent free microwave extraction

^f HD : hydro-distillation

^h CP : cold pressing

Clean production rapidity:

The SFME is clearly quicker than its conventional counterparts. The extraction takes 10 min., whilst 1 hour and 3 hours were required by cold pressing and hydro-distillation, respectively. For the case of CP, an additional time of centrifugation (30 min.) of the emulsion containing essential oil could be added to the real extraction time (1 h.). For HD or SFME, the extraction temperature is equal to water boiling temperature at atmospheric pressure (100°C). To reach this extraction temperature (100°C) and thus obtain the distillation of the first essential oil droplet, it is necessary to heat only 2 min. with SFME against 30-40 min. for HD.

Clean production efficiency:

Table's 1 compare essential oil yields as well as the oxygenated fraction contents present in the essential oil from SFME, HD and CP. Yields express in grams of essential oil by 100 grams of orange fruits. The essential oil yield from SFME (0.4%) was substantially equal to HD (0.4%) and higher than CP (0.16%). The oxygenated fraction in essential oil samples from SFME (1.6%) was 40 % higher than HD (0.82%) and 30% higher than CP (0.95%).

Monoterpene hydrocarbons are less valuable than oxygenated compounds in terms of their contribution to the fragrance of the essential oil. Conversely, the oxygenated compounds are highly odoriferous and, hence, the most valuable. The monoterpene hydrocarbons (limonene...) are present in larger amounts in the hydro-distilled essential oil than the SFME essential oil, but the extract obtained by SFME is more concentrated in oxygenated compounds. The greater proportion of oxygenated compounds in the SFME essential oils is probably due to the diminution of thermal and hydrolytic effects, compared with CP which uses a large quantity of water and with HD which is time and energy consuming. Water is a polar solvent, which accelerates many reactions, especially reactions *via* carbocation as intermediates. Great differences between the compositions for these extraction methods can be noted for the extraction of essential oil from orange peels. The essential oil of orange peels isolated either by SFME, CP and HD contains the same dominant components. Linalol was the main oxygenated component in the essential oil extracted from orange peels but the relative amounts differed for the three extraction methods. It is the most abundant oxygenated component of the SFME extract 0.62%, whereas the HD and CP extracts contain 0.3%. For the case of CP extraction, orange essential oil is agitated vigorously with water, a gradual diminution of water soluble oxygenated compounds occurs. Colloid substances always accompany the liberated orange oil, tending to promote emulsification. Therefore, CP gives lower extraction yields and lower oxygenated compounds content but it is the reference for *Citrus* oil extraction because of the fresh aroma resulting from the CP extraction of essential oil.

Clean Production messages:

SFME is proposed an "environmentally friendly" extraction method suitable for sample preparation prior to essential oil analysis. SFME is a very clean method, which avoids residue generation (CP) and the use of large quantity of water and voluminous extraction vessels (HD). The reduced cost of extraction is clearly advantageous for the proposed SFME method in terms of energy and time. The energy required to perform the three extraction methods are respectively 3 kW.h for HD (electrical energy for heating and evaporating), 0.1 KW.h for SFME (electrical energy for microwave supply), and 1 kW.h for CP (electrical energy for mechanical motor). Regarding environmental impact, the calculated quantity of carbon dioxide rejected in the atmosphere is higher in the case of HD (3464 g CO₂/ g of essential oil) than for SFME (70 g CO₂/ g of essential oil). These calculations have been made according to literature: to obtain 1 kW h from coal or fuel, 800 g of CO₂ will be rejected in the atmosphere during combustion of fossil fuel [10].

Solvent Free Microwave Extraction mechanisms:

Understanding, on the molecular scale, of processes relevant to microwave extraction has not yet reached the degree of maturity of other topics in extraction. Such a challenge is somewhat ambitious and requires a special approach. Microwave extraction interferes with polarization effects that cannot be easily separated from physical and chemical properties of extracted molecules. Solvent free microwave extraction and partitioning of aromatic compounds may occur by one of these two proposed extraction mechanisms or as a combination:

• For a sample with a high dielectric loss (high water content), efficient extractions can be performed using only microwaves without added any solvent or water. This is possible since the water inside the sample matrix will be locally heated. Microwaves interact with the free water molecules present in the glands and vascular systems. Thus, such systems undergo a dramatic expansion, with subsequent rupture of the tissue, allowing the essential oil to flow towards the water layer. This Mechanism I is based also on the ability of essential oil components to dissolve in water. The solubilisation is then the limiting step and solubility becomes the essential parameter which induces the microwave SFME selective extraction.

• Essential oils contain organic compounds that strongly absorb microwave energy (Mechanism II). Compounds with high and low dipolar moments could be extracted in various proportions by microwave extraction. Organic compounds that have a high dipolar moment will interact more vigorously with microwaves and can be extracted more easily in contrast with aromatic compounds which have low dipolar moments.

Conclusion:

Microwave energy is a key enabling technology in achieving the objective of sustainable “clean” production for research, teaching and commercial applications. It has been shown that solvent-free conditions are especially suited to microwave-assisted organic synthesis, as reactions can be run safely under atmospheric pressure in the presence of significant amounts of products. Solvent free microwave extraction has been conceived following the concepts of solvent free microwave synthesis. When coupled to microwave radiation, solvent free techniques have proved to be of special efficiency as clean and economic procedures. Major improvements and simplifications over conventional methods originate from their rapidity, their enhancement in yields and product purities.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank the students and researchers enrolled in the chemical laboratories at Département de Technologie des Industries Agricoles et Alimentaires, Institut National Agronomique (INA), 16200 El-Harrach, Alger, Algeria and Université des Sciences et Technologies Houarai Boumediène (Algeria) for their assistance in optimizing and testing this clean extraction experiment in the research and teaching laboratories.

REFERENCES

- [1] Reverchon, E., 1997. J. Supercrit. Fluids 10: 1.
- [2] Vinatoru, M., 2001. Ultrason. Sonochem. 8: 303.
- [3] Jimenez-Carmona, M.M., J.L. Uberta, M.D. Luque de Castro, 1999. J. Chromatogr. A. 855: 625.
- [4] Rezzoug, S.A., N. Louka, K. Allaf, 2000. J. Essent. Oil Res., 3: 336.
- [5] Craveiro, A.A., F.J.A. Matos, J.W. Alencar, 1989. Flavour Frag. J. 4: 43.
- [6] Milestone srl, Via Fratebenefratelli, 1/5, I-24010 Sorisole, Bergamo, Italy; www.milestonesrl.com.
- [7] Demonstration procedure is available in the electronic supplementary information of this journal.
- [8] Clevenger, J.F., 1928. American Perfumer and Essential Oil Review, pp: 467.
- [9] Adams, R.P., 1995. Identification of essential oil components by gaz chromatography / mass spectroscopy, Allured Publishing Corporation, Carol Stream.
- [10] Bernard, J., 2001. Sciences et vie, 214: 68.

Résumé

Un nouveau procédé non conventionnelle d'extraction des huiles essentielles «L'Extraction Sans Solvant par Micro-ondes (ESSAM)». Ce procédé est basé sur la combinaison d'une technique d'extraction classique : la distillation et le chauffage micro-ondes comme technologie d'intensification. Une nouvelle approche pour l'extraction des huiles essentielles à partir des matrices aromatiques et sans ajout de vapeur d'eau ni solvant a été appliqué à l'extraction des huiles essentielles des écorces des citrus : orange d'Algérie. L'ESSAM et une des procédures « *douce* » permettant un gain de temps et d'énergie considérable et la diminution des rejets. L'application de l'huile essentielle d'orange extraite par ESSAM sur une matrice alimentaire d'origine animale (œufs entiers liquides frais) a permis d'obtenir des résultats probants. En effet une concentration de l'ordre de 0,5% en Huile essentielle d'orange s'avère plus efficace pour le maintien des caractéristiques qualitatives de l'œuf entier liquide durant toute la période de stockage en vitrine illuminée.

Mots-clés : Citrus, Ecorces d'orange, Huile essentielles, Micro-ondes, ESSAM, DPPH, SR TBA, Indice de couleur, Œuf entier liquide, Analyse sensorielle, Bioconservation, Shelf life.

ملخص

تم تطبيق عملية جديدة لاستخراج الزيوت الأساسية "استخراج بميكروويف بدون المذيبات. ESSAM. وتستند هذه العملية على الجمع بين تقنية استخراج كلاسيكية: التقطير والتدفئة بالميكروويف كتقنية تكثيف. تم تطبيق نهج جديد لاستخراج الزيوت الأساسية من المواد العطرية وبدون إضافة بخار الماء أو المذيب لاستخراج الزيوت الأساسية من لحاء الحمضيات: البرتقال في الجزائر. ESSAM واحدة من الإجراءات "التي تتيح توفير كبير للوقت والطاقة والحد من المخلفات. تطبيق الزيت الأساسي للبرتقال المستخرجة على مادة غذائية من أصل حيواني (البيض السائل الطازج) جعل من الممكن الحصول على نتائج مقنعة، في الواقع تركيز 0.5% من الزيت الأساسي للبرتقال أكثر فعالية في الحفاظ على خصائص جودة البيض السائل الطازج طوال فترة التخزين في مكان مضيئ.

كلمات البحث: الحمضيات، قشر البرتقال، الزيوت الأساسية، ميكروويف، ESSAM، DPPH، SR TBA، مؤشر اللون، البيض السائل، التحليل الحسي، الحفظ الطبيعي، Shelf life.

Abstract

A new unconventionally extraction process for essential oils «Solvent free Microwave Extraction» has been applied. This process is based on the combination of a classical extraction technique: distillation and microwave heating as intensification technology. A new approach for the extraction of essential oils from aromatics matrices and without the addition of steam water or solvent has applied to the extraction of essential oils from Algerian citrus: orange peels. SFME and one of the "soft" procedures allowing a considerable saving of time and energy and the reduction of the rejections. The application of the orange oil extracted by SFME on a food animal matrix (the fresh whole eggs liquid) allowed obtaining convincing results. Indeed a concentration of about 0,5% orange essential oil is more effective for maintaining the quality characteristics of the liquid whole eggs during display.

Keywords: Citrus, Orange Peels, Essential oil, Microwaves, SFME, DPPH, TBA RS, Color index, liquid whole eggs, Sensory analysis, Bioconservation, Shelf life.