

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Democratique et Populaire  
Ministere de l'Enseignement Superieur  
et de la Recherche Sientifique



Université de Jijel  
Faculté des Sciences de la Nature  
et de la Vie  
Département de Microbiologie Appliquée  
et des Sciences Alimentaires

جامعة جيجل  
كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم الميكروبيولوجيا التطبيقية و علوم التغذية

## Thèse de Doctorat en Biologie Option : Sciences Alimentaires

Présentée par :  
M<sup>me</sup> Boussaa née Bouhanna Imane

Intitulé

**Le fruit d'*Arbutus unedo* L.: composition biochimique,  
potentiel antioxydant et antimicrobien et application  
dans les procédés de bio conservation**

Soutenu le 26/07/2021

Membres de jury :

**Président : P<sup>r</sup>. SIFOUR. M**  
**Rapporteur de thèse : P<sup>r</sup>. IDOUI. T**  
**Examinatrice : P<sup>r</sup>. BECILA. S**  
**Examinatrice : P<sup>r</sup>. BARKAT. M**

**Université M.S.B. Jijel**  
**Université de F.M Constantine 1**  
**Université de F.M Constantine 1**  
**Université M.S.B. Jijel**

Année Universitaire : 2020-2021

<b>Remerciement</b>	
<b>Dédicace</b>	
<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Liste des figures</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Introduction</b> .....	01

*I. Synthèse bibliographique*

**Chapitre 1. Caractéristiques et composition biochimique d'*Arbutus unedo* L.**

I.1.1. Etymologie et historique d' <i>Arbutus unedo</i> Linné.....	04
I.1.2. Origine et distribution.....	04
I.1.3. Position systématique.....	05
I.1.4. Écologie et acclimatation.....	05
I.1.5. Caractéristiques botaniques.....	06
I.1.5.1. Arbre.....	06
I.1.5.2. Feuilles et fleurs.....	06
I.1.5.3. Fruits et grains.....	07
I.1.6. Composition biochimique d' <i>A. unedo</i> .....	07
I.1.6.1. Composés chimique et nutritifs.....	07
I.1.6.2. Composés phytochimiques.....	08
I.1.6.3. Influence du stade de maturation sur la composition.....	11
I.1.7. Propriétés biologique du fruit d' <i>A. unedo</i> .....	12
I.1.7.1. Activité antioxydante.....	12
I.1.7.2. Activité antimicrobienne.....	13
I.1.7.3. Activité antiproliférative.....	13
I.1.8. Utilisation du fruit d' <i>A. unedo</i> .....	14
I.1.8.1. Utilisations alimentaires.....	14
I.1.8.2. Utilisations en technologie alimentaire.....	15
I.1.8.3. Utilisations médicales.....	16

**Chapitre 2. Emballage actif et conservation des aliments**

I.2.1. Emballage actif.....	17
I.2.2. Systèmes des emballages actifs.....	17
I.2.2.1. Capteurs d'oxygène.....	18
I.2.2.2. Capteurs et émetteurs de dioxyde de carbone.....	19
I.2.2.3. Capteurs d'humidité.....	19
I.2.2.4. Emballage antioxydant.....	20
I.2.2.5. Emballage antimicrobien.....	21
I.2.3. Les polymères naturels utilisés dans les emballages actifs.....	22
I.2.3.1. Gélatine.....	23
I.2.3.2. Amidon.....	24
I.2.3.3. Chitosane.....	24
I.2.4. Emballage actif et la bioconservation des aliments.....	25

**II. Matériel et Méthodes**

II.1. Matériel biologique.....	26
II.1.1. Fruit d' <i>A. unedo</i> .....	26
II.1.2. Sardine commune ( <i>Sardina pilchardus</i> ).....	26
II.1.3. Beurre traditionnel.....	27
II.1.4. Souches cibles.....	27
II.2. Méthodes .....	27
II.2.1. Détermination des paramètres morphologiques du fruit .....	27
II.2.2. Détermination des caractères physico-chimiques du fruit.....	28
II.2.2.1. Teneur en eau et en matière sèche.....	28
II.2.2.2. Teneur en cendres et en matière organique .....	28
II.2.2.3. pH .....	29
II.2.2.4. Acidité titrable.....	29
II.2.2.5. Taux des solides solubles .....	29
II.2.2.6. Teneur en vitamine C.....	30
II.2.2.7. Teneur en azote total .....	30
II.2.2.8. Teneur en lipides.....	31
II.2.2.9. Teneur en sucres totaux.....	31
II.2.2.10. Teneur en pectine.....	32
II.2.2.11. Teneur en fibres brutes.....	33
II.2.3. Etude phyto-chimique du fruit d' <i>A. unedo</i> pendant la maturation.....	33
II.2.3.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux.....	33
II.2.3.2. Evaluation du pouvoir antioxydant des EFA.....	35
II.2.4. Analyse de l'EFR par HPLC-DAD.....	37
II.2.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne des EFA.....	38
II.2.5.1. Préparation des inoculums et des extraits.....	38
II.2.5.2. Test de l'activité antimicrobienne .....	38
II.2.6. Application de l'EFR dans la conservation des aliments.....	39
II.2.6.1. Préparation des films d'emballage à base de gélatine.....	39
II.2.6.2. Propriétés physico-chimiques du film .....	40
II.2.6.3. Etude de l'effet du film sur l'oxydation du beurre .....	42
II.2.6.4. Etude de l'effet antibactérien du film sur la sardine .....	43
II.2.7. Analyse statistique des résultats .....	46

**III. Résultats et Discussion**

III.1. Morphologie et physico-chimie du fruit d' <i>A.unedo</i> .....	47
III.1.1. Caractéristiques morphologiques du fruit.....	47
III.1.2. Paramètres physicochimiques du fruit.....	48
III.1.2.1. Teneur en eau et en matière sèche.....	49
III.1.2.2. Teneur en cendres et en matière organique.....	50
III.1.2.3. pH et acidité titrable.....	50
III.1.2.4. Taux des solides solubles totaux.....	51
III.1.2.5. Teneur en Vitamine C.....	52
III.1.2.6. Teneur en azote total et protéines.....	52
III.1.2.7. Teneur en lipides.....	53
III.1.2.8. Teneur en sucres totaux.....	54
III.1.2.9. Teneur en pectines.....	55
III.1.2.10. Teneur en fibres totales.....	55
III.2. Phytochimie de l'EFA pendant la maturation.....	56

## *Table de matières*

---

III.2.1. Teneur en composés phénoliques .....	57
III.2.1.1. Rendement d'extraction.....	57
III.2.1.2 Phénols totaux.....	57
III.2.1.3. Flavonoïdes.....	58
III.2.1.4. Tannins condensés.....	59
III.2.2. Activités antioxydantes des EFA.....	59
III.2.2.1. Capacité antioxydante totale .....	59
III.2.2.2. Réduction de fer .....	61
III.2.2.3. Piégeage du radical libre DPPH <sup>•</sup> .....	62
III.2.2.4. Activité antioxydante mesurée par le radical cation ABTS <sup>+</sup> .....	64
III.2.2.5. Piégeage du peroxyde d'hydrogène.....	66
III.3. Composition de l'EFR analysé par HPLC-DAD.....	68
III.4. Activité antimicrobienne des EFA.....	70
III.5. Application du fruit d' <i>A. unedo</i> dans la conservation des aliments.....	75
III.5.1. Caractérisation des films préparés.....	75
III.5.1.1. Caractéristiques macroscopiques.....	75
III.5.1.2. Propriétés physico-chimiques.....	77
III.5.1.3. Détection des groupes fonctionnels et des changements structuraux dans les films .....	80
III.5.2. Effet du film sur l'oxydation du beurre.....	81
III.5.2.1. Acidité du beurre.....	82
III.5.2.2. Teneur en peroxyde.....	83
III.5.2.3. Indice TBARS.....	84
III.5.3. Effet antibactérien du film et conservation de la sardine.....	86
III.5.3.1. Analyse de la matière première.....	86
III.5.3.3. Évaluation du pH de la sardine pendant le stockage.....	87
III.5.3.4. Activité antibactérienne du film .....	89
<b>Conclusion</b> .....	94
<b>Références bibliographiques</b> .....	96

### **Annexes**

## *Remerciements*

---

Je tiens à remercier vivement le professeur **Tayeb IDOUI**, pour la confiance qu'il m'a témoignée en acceptant la direction scientifique de mes travaux. Je lui suis reconnaissante de m'avoir fait bénéficier tout au long de ce travail, de sa grande compétence et de sa rigueur intellectuelle.

Je suis très honoré à remercier mon jury de thèse **Mohamed SIFOUR**, Professeur à l'Université de Jijel pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury. Je tiens à l'assurer de ma profonde reconnaissance pour l'intérêt qu'il porte à ce travail.

J'exprime mes sincères remerciements à Madame **Samira BECILA**, Professeur à l'Université de Constantine 1, pour le temps consacré à la lecture de cette thèse, et pour les suggestions et les remarques judicieuses qu'elle m'a indiquées.

Mes remerciements les plus sincères vont également à Madame **Malika BARKAT**, Professeur à l'Université de Constantine 1 pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes remerciements les plus cordiaux vont aussi à Monsieur **Abdecharif BOUMAZA** Professeur à l'Université de Khenchela pour accepter de me faire les analyses par la spectroscopie infrarouge.

A titre plus personnel, je remercie chaleureusement mon mari, **Abdelhalim BOUSSAA**, MAA à l'Université de Khenchela, pour la grande patience, l'encouragement et la confiance qu'il m'a témoigné. Je tiens à le remercier surtout pour son soutien moral ininterrompu, ses aides au niveau de laboratoire et ses nombreux conseils tout le long de ma thèse.

Ces remerciements ne seraient être complets sans un mot pour mes collègues avec qui de belles amitiés se sont développées. Je remercie vivement les personnes qui ont apporté leur aide pour la réalisation de ce travail.

## Dédicace

---

Je dédie cette thèse

### *A ma petite famille*

Mon très cher Mari **Abdelhalim**, source d'Amour et de tendresse

Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon amour et mon attachement à toi. Depuis que je t'ai connu, tu n'as cessé de me soutenir et de m'épauler. Tu me voulais toujours le meilleur.

Ton amour ne m'a procuré que confiance et stabilité. Tu as partagé avec moi les meilleurs moments de ma vie, aux moments les plus difficiles de ma vie, tu étais toujours à mes côtés, Je te remercie de ne m'avoir jamais déçu.

Aucun mot ne pourrait exprimer ma gratitude, mon amour et mon respect. Je remercie le bon dieu qui a croisé nos chemins. Puisse le bon dieu nous procure santé et longue vie.

Et mes petits anges **Mohamed raouf** et **María**

Puisse Dieu tout puissant, vous préserver et vous accorder santé, longue vie et Bonheur.

### *A mes chers parents*

En témoignage de brut d'années de sacrifices, de sollicitudes, d'encouragement et de prières, Pourriez-vous trouver dans ce travail le fruit de toutes vos peines et tous de vos efforts.

En ce jour, j'espère réaliser l'un de tes rêves.

Aucune dédicace ne saurait exprimer mes respects, ma reconnaissance et mon profond amour.

## *Dédicace*

---

*Puisse Dieu vous préserver et vous procurer santé, longue vie et  
bonheur*

*A mes chers frères et chères sœurs*

*Ilyas,*

*Houssein,*

*Bouchra,*

*Hassiba,*

*Abir*

*et surtout*

*NIHAD*

*Puisse Dieu tout puissant, vous préserver et vous accorder santé,  
Bonheur et longue vie pleine de succès.*

## *Liste des abréviations*

---

<b>AA</b> : Acide ascorbique	<b>IS</b> : Indice de saponification
<b>ABTS</b> : L'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)	<b>M-H</b> : Mueller-Hinton
<b>ATCC</b> : American Type Culture Collection	<b>NCCLS</b> : National Committee for Clinical Laboratory Standards
<b>CAT</b> : Capacité antioxydante totale	<b>PCA</b> : Plate count agar
<b>CIP</b> : Cold isostatic press	<b>PV</b> : Peroxyde value
<b>CMB</b> : Concentration minimale bactéricide	<b>PVE</b> : Perméabilité à la vapeur d'eau
<b>CMF</b> : Concentration minimale fongicide	<b>SFF</b> : Solution formant de film
<b>CMI</b> : Concentration minimale inhibitrice	<b>T</b> : Trolox
<b>CT</b> : Coliformes totaux	<b>TBARS</b> : Thio-barbituric acid reactive substances
<b>CTT</b> : Coliformes thermo-tolérants	<b>TN</b> : Témoin négatif
<b>DMSO</b> : Diméthylsulfoxyde	<b>TSS</b> : Taux des solides solubles
<b>DPPH</b> : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl	<b>UFC</b> : Unité formant une colonie
<b>EC 50</b> : Effective concentration 50	<b>VRBL</b> : Violet Red Bile Lactose Agar
<b>EFA</b> : Extrait de fruit d'Arbutus	
<b>EFJ</b> : Extrait de fruit jaune	
<b>EFR</b> : Extrait de fruit rouge	
<b>EFV</b> : Extrait de fruit vert	
<b>FA</b> : Film à tester	
<b>FJ</b> : Fruit jaune	
<b>FR</b> : Fruit rouge	
<b>FRAP</b> : Ferric Reducing Antioxidant Power	
<b>FT</b> : Film témoin	
<b>FTAM</b> : Flore totale aérobie mésophile	
<b>FTIR</b> : Fourier Transform Infrared Spectroscopy	
<b>FV</b> : Fruit vert	
<b>HPLC-DAD</b> : High-performance liquid chromatography with diode-array detection	
<b>HR</b> : Humidité relative	
<b>IC50</b> : Inhibitrice concentration 50	



## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Distribution mondiale d' <i>A. unedo</i> .....	04
<b>Figure 2.</b> Aspect de l'arbre d' <i>A. unedo</i> .....	06
<b>Figure 3.</b> Fleurs et fruits d' <i>A.unedo</i> .....	07
<b>Figure 4.</b> Quelques composés phénoliques présents dans le fruit d' <i>A. unedo</i> .....	09
<b>Figure 5.</b> Quelques structures de dérivés de galloyl, tanins et flavonols présent dans le fruit d' <i>A. unedo</i> .....	10
<b>Figure 6.</b> Systèmes de l'emballage actif.....	18
<b>Figure 7.</b> Echantillon des fruits d' <i>A. unedo</i> en trois stades de maturation.....	26
<b>Figure 8.</b> CAT de l'EFA à différentes concentrations .....	60
<b>Figure 9.</b> EC50 de l'EFA pour l'activité antioxydante totale .....	60
<b>Figure 10.</b> FRAP de l'EFA à différentes concentrations .....	61
<b>Figure 11.</b> EC50 de l'EFA pour le pouvoir réducteur.....	62
<b>Figure 12.</b> Piégeage du radical libre DPPH <sup>•</sup> par l'EFA à différentes concentrations .....	63
<b>Figure 13.</b> EC 50 de l'EFA pour le piégeage de radical DPPH.....	64
<b>Figure 14.</b> Inhibition du radical libre ABTS <sup>+</sup> par l'EFA à différentes concentrations .....	65
<b>Figure 15.</b> EC50 de l'EFA pour l'inhibition du radical ABTS <sup>+</sup> .....	65
<b>Figure 16.</b> Inhibition du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> par l'EFA à différentes concentrations .....	66
<b>Figure 17.</b> EC50 de l'EFA pour le piégeage du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	67
<b>Figure 18.</b> Activité antibactérienne des EFA aux trois stades de maturation .....	71
<b>Figure 19.</b> Activité antifongique des EFA aux trois stades de maturation.....	72
<b>Figure 20.</b> Photographie des films préparés.....	76
<b>Figure 21.</b> Spectres FTIR de FT et FA.....	80
<b>Figure 22.</b> Evolution de l'acidité du beurre au cours du stockage réfrigéré.....	82
<b>Figure 23.</b> Evolution de la PV du beurre au cours du stockage réfrigéré.....	83
<b>Figure 24.</b> Evolution de l'indice TBARS du beurre au cours du stockage réfrigéré.....	84
<b>Figure 25.</b> Evolution du pH des sardines inoculées par <i>S. aureus</i> pendant la conservation.....	87
<b>Figure 26.</b> Evolution du pH des sardines inoculées par <i>L. monocytogenes</i> pendant la conservation .....	88
<b>Figure 27.</b> Evolution du pH des sardines inoculées par <i>P. aeruginosa</i> pendant la conservation .....	88
<b>Figure 28.</b> Evolution du nombre de <i>S. aureus</i> pendant la conservation.....	90
<b>Figure 29.</b> Evolution du nombre de <i>L. monocytogenes</i> pendant la conservation.....	90

**Figure 30.** Evolution du nombre de *P. aeruginosa* pendant la conservation ..... 91

## *Liste des tableaux*

---

<b>Tableau 1.</b> Classification taxonomique d' <i>A. unedo</i> .....	05
<b>Tableau 2.</b> Composition chimique et nutritionnelle du fruit d' <i>A. unedo</i> (g/kg).....	08
<b>Tableau 3.</b> Paramètres morphologiques des fruits d' <i>A. unedo</i> aux trois stades de maturation.....	48
<b>Tableau 4.</b> Paramètres physicochimiques du fruit aux trois stades de maturation.....	49
<b>Tableau 5.</b> Evolution du rendement d'extraction et teneur en polyphénols totaux durant la maturation.....	57
<b>Tableau 6.</b> Identification et quantification des composés phénoliques présents dans l'EFR par LC-DAD.....	69
<b>Tableau 7.</b> Diamètres des zones d'inhibition des EFA aux trois stades de maturation vis-à-vis les souches microbiennes testées.....	73
<b>Tableau 8.</b> CMI, CMB, CMF et le rapport CMB/CMI (CMF/CMI) des EFA aux trois stades de maturation vis-à-vis les souches microbiennes testées.....	74
<b>Tableau 9.</b> Caractéristiques physiques des films préparés.....	77
<b>Tableau 10.</b> pH initial et charges microbiennes initiale (UFC / g) de la sardine testée...	86

# **Introduction**

*Arbutus unedo* L., communément appelé arbousier, est un arbuste à feuilles persistantes appartenant à la famille des *Ericaceae* et originaire de la région méditerranéenne. Il a été utilisé comme aliment et médicament, apportant une contribution importante à la santé des communautés locales. Dans la littérature, les fruits et les feuilles sont caractérisés par la présence de substances bioactives telles que les polyphénols, les acides aromatiques, les iridoïdes, les terpénoïdes, les stérols et les flavonoïdes, ce qui peut expliquer leurs propriétés nutraceutiques et pharmacologiques (Ayaz et al., 2000; Barros et al., 2010; Albuquerque et al., 2017a,b).

Les baies mûres d'arbousier peuvent être classées comme des fruits à très forte teneur en caroténoïdes. La couleur attrayante, le pouvoir énergétique dû à la forte concentration en sucre et l'apport précieux en acides gras polyinsaturés de ces fruits sauvages, en font un aliment distinctif (Barros et al., 2010; Delgado-Pelayo et al., 2016).

Cependant, en Algérie, toutes utilisations des fruits d'*A. unedo* restent des habitudes traditionnelles et ces fruits ne sont pas utilisés pour la fabrication de produits dérivés de grande valeur. Les arbouses peuvent être valorisés à travers d'autres nouvelles utilisations, telles que la fabrication de boissons non alcoolisées, l'incorporant dans les yaourts, les garnitures de dessert et les produits céréaliers ou comme source de composés bioactifs dans l'industrie agro-alimentaire.

L'un des objectifs les plus importants du scientifique alimentaire est de rendre les aliments aussi sains que possible, qu'ils soient utilisés frais ou transformés. La conservation des aliments est une action ou une méthode conçue pour maintenir les aliments à un niveau de qualité souhaité. Un certain nombre de nouvelles techniques de conservation sont en cours de développement pour répondre aux exigences actuelles de conservation économique et de satisfaction des consommateurs en termes de sécurité, de nutrition et d'aspects sensoriels (Sancho-Madriz, 2003).

L'application de films et de revêtements dans l'industrie de l'emballage alimentaire a sensiblement augmenté au cours des dernières décennies pour maintenir la sécurité et la qualité des aliments et prolonger ainsi sa durée de conservation (Gallego et al., 2020). L'emballage actif est défini comme «un mode d'emballage dans lequel l'emballage, le produit et l'environnement interagissent pour prolonger la durée de conservation ou améliorer la sécurité et / ou la qualité du produit alimentaire» (Suppakul et al., 2003).

La demande des consommateurs pour la conservation naturelle des aliments a conduit à étendre l'utilisation de biopolymères comestibles obtenus à partir de sous-produits industriels. À cet égard, la gélatine est largement utilisée dans les emballages alimentaires en raison de son faible coût, de sa grande disponibilité, de son acceptabilité sensorielle et de ses propriétés fonctionnelles et technologiques. De plus, il en résulte avantageusement en termes de durabilité environnementale, car la gélatine est obtenue à partir de l'hydrolyse partielle de la protéine de collagène principalement présente dans les sous-produits animaux tels que la peau, les os, les tendons et les tissus conjonctifs (**Ramos et al., 2016 ; Etxabide et al., 2017**).

De plus, l'ajout de composés antioxydants naturels dans les films à base de gélatine s'est avéré efficace pour prolonger la durée de conservation des aliments en retardant les processus d'oxydation affectant les protéines, les pigments et les lipides. À cet égard, les composés phénoliques, les huiles essentielles, l' $\alpha$ -tocophérol, les polysaccharides et les peptides ont été largement utilisés pour enrichir les films de gélatine (**Jridi et al., 2018; Li et al., 2020**).

En outre, la demande des antimicrobiens naturels a augmenté en raison des risques pour la santé associés aux antimicrobiens synthétiques. Les matériaux d'emballages antimicrobiens, inhibent la croissance des microbes en raison de la libération contrôlée de composés bioactifs piégés (**Sadiq et al., 2015; Ahmed et al., 2018**).

Les poissons représentent une source importante de nutriments du régime alimentaire méditerranéen. Parmi les espèces, la sardine représente le poisson le plus consommé (**Zlatanov et Laskaridis, 2007**). Néanmoins, la sardine est un aliment périssable dont la durée de conservation est limitée par une détérioration enzymatique et microbiologique. En effet, plusieurs études ont rendu compte de l'incidence de bactéries pathogènes pouvant causer des problèmes de santé majeurs en raison de la présence de *Salmonella* spp., *Vibrio* spp., *Listeria*, *Pseudomonas* et de nombreuses bactéries d'altération (**Mol et al., 2007**).

Par ailleurs, l'oxydation des lipides est un facteur majeur affectant la qualité des produits laitiers, en particulier lors de longues périodes de stockage. Des saveurs suifantes, huileuses et de poisson, qui sont considérées comme étant causées par l'oxydation, ont été observées dans le beurre depuis le début de stockage. Le caractère répréhensible de ces contre-saveurs a causé des pertes qui ont attiré l'attention des enquêteurs et des consommateurs (**Koyuncu et Tuncturk, 2017**).

## *Introduction*

---

Ainsi, pour une bonne préservation de la qualité des produits alimentaire périssable tel que les produits de la mer et ceux sensible à l'oxydation, la recherche sur les emballages actif à base de substances naturelles est actuellement une des préoccupations des scientifiques. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre présente thèse et qui a pour objectifs :

- ✓ De déterminer la qualité nutritionnelle de fruit d'*A. unedo* aux trois stades de maturation ;
- ✓ De déterminer la composition pythochimique du fruit ;
- ✓ D'étudier les activités antioxydante et antimicrobienne des extraits de ce fruit ;
- ✓ De développer un emballage actif à base de la gélatine incorporé de l'extrait de fruit mature et de tester ses activités sur le beurre du lait de vache traditionnel et de la sardine pendant la conservation à basse température.

Il important de noter que jusqu'à la rédaction de ce manuscrit, aucune étude n'a été portée sur l'incorporation de l'extrait de fruit d'*A.unedo* dans une matrice afin de développer un emballage alimentaire.

# **I- Synthèse bibliographique**



# **Chapitre 1**

Caractéristiques et composition  
biochimique d'*Arbutus unedo* L.

### I.1.1. Etymologie et historique d'*Arbutus unedo* Linné

*Arbutus* est le nom latin de l'arbusier. Il peut être le diminutif d'*Arbor*, l'arbre, mais aussi provenir du terme celtique « arbois », fruit raboteux, qui rendrait compte du toucher de l'arboise. Les arboises ont été consommées par les populations préhistoriques, dans l'Hérault, près du village d'Argelliers, sur un site néolithique daté d'environ 2800 avant notre ère, les fouilles ont permis d'identifier des arboises parmi les restes trouvés dans une maison de pierres sèches qui avait brûlé à cette lointaine époque. De nos jours, ces petits fruits restent un complément alimentaire abondant et facile à ramasser (Tonelli et Gallouin, 2013).

### I.1.2. Origine et distribution

*Arbutus unedo* L. (*A. unedo*), est un arbuste à feuilles persistantes, originaire de la région méditerranéenne, on peut le trouver du niveau de la mer jusqu'à 600m d'altitude voir 1200 m en Europe occidentale, centrale et méridionale, l'Afrique Nord-Est (à l'exclusion de l'Égypte et la Libye) et les îles Canaries et l'Asie occidentale, où le froid n'est pas très habituel et la sécheresse d'été n'est pas très intense (Kim, 2012 ; Tonelli et Gallouin, 2013).

En Europe, il se développe la plupart du temps dans le bassin méditerranéen (Portugal, Espagne, France, Italie, Albanie, la Grèce, la Bosnie et l'Herzégovine, Croatie, Macédoine, Monténégro, la Serbie et la Slovaquie) y compris quelques îles méditerranéennes (Baléares, La Corse, la Sardaigne, la Sicile et la Crète), principalement dans les régions côtières et intérieures où le climat est favorable pour leur développement, il peut également s'adapter à la côte du Sud-Ouest de l'Irlande (Figure 1) (Torres et al., 2002).



**Figure 1.** Distribution mondiale d'*A. unedo* (Oliveira et al., 2010)

### I.1.3. Position systématique

La famille des *Ericacées* comprend 87 genres et 1500 espèces, distribuées dans toutes les latitudes, réunis dans des formations végétales très caractéristiques. Le genre *Arbutus* comprend 12 espèces. Il faut signaler l'existence d'un hybride entre *A. unedo* et *A. andrachne* (Scortichini, 1986). La classification botanique d'*A.unedo* est résumée dans le **tableau 1**.

**Tableau 1.** Classification taxonomique d'*A. unedo* (Mendes, 2010)

Rang taxonomique	Signification
Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Spermatophyta</i>
Sous-Embranchement	<i>Angiospermae</i>
Classe	<i>Magnolopsida</i>
Sous-classe	<i>Dilleniideae</i>
Ordre	<i>Ericales</i>
Famille	<i>Ericaceae</i>
Sous famille	<i>Arbutoideae</i>
Genre	<i>Arbutus</i>
Espèce	<i>Arbutus unedo</i> Linné

Ce fruit est connu sous plusieurs noms vernaculaires, en Algérie s'appelle Ticisnou, Acisnou ou bien Lendj, dans les pays Européens méridionaux ; ervedeiro, medronheiro en Portugal, albocera, alborocera, borrachín, madroñera, madroño en Espagne, corbezzolo, peloso de sorbo en Italie, et koumaria en Grèce (Kim, 2012).

### I.1.4. Écologie et acclimatation

*A.unedo* est une espèce sensible aux grands froids, préfère les sols siliceux ou décarbonatés et peut se développer sur les sols alcalins et relativement acides (pH 5-7.2) (Celikel et al., 2008; Gomes et al., 2011). Cette espèce peut vivre jusqu'à 400 ans, elle a une importance écologique énorme puisqu'elle empêche l'érosion des sols et elle a également la capacité de se régénérer rapidement après les feux, survivant tout à fait bien sur les sols pauvres (Takrouni et Boussaid, 2010). Cependant, quelques études ont démontré que la sécheresse et les basses températures retardent la floraison et le développement du fruit (Ogaya et Peñuelas, 2004 ; Molina et al., 2011).

### I.1.5. Caractéristiques botaniques

#### I.1.5.1. Arbre

L'arbousier est un petit arbre de 1.5 à 3 m d'hauteur mais peut atteindre 9 à 12 m, un arbuste touffu et très rameux au tronc court, robuste et sa ramure souple lui confère une silhouette arrondie, l'écorce des branches est brun-rouge et, avec l'âge, elle s'écaille et part en lambeaux rubanés; les jeunes pousses rougeâtres et poilues ont un aspect velouté. L'arbousier a un enracinement profond de type pivotant (il s'insinue souvent dans les éboulis et les roches faillées), il croît lentement mais peut devenir pluri centenaire (**Figure 2**) (**Celikel et al., 2008 ; Tonelli et Gallouin, 2013**).



**Figure 2.** Aspect de l'arbre d'*A. unedo* (**Tonelli et Gallouin, 2013**)

#### I.1.5.2. Feuilles et fleurs

Son beau feuillage dense est persistant, en disposition alterne, se renouvellent progressivement après 1 ou 2 ans, courtement pétiolées (de 1 cm ou de moins), sans stipules, elles sont coriaces, alternatives, épaisses, simples, elliptiques, entières ou dentées de 4 à 8 cm de longueur sur 2 à 4 cm de largeur. Elles sont luisantes et d'un beau vert sombre dessus et vert pâle un peu argenté dessous (**Maleš et al., 2006 ; Tonelli et Gallouin, 2013**).

Les fleurs sont en forme de cloche, de longueur 8 à 9 millimètres, rassemblées en grappes rameuses et terminales, bisexuées, rétrécie au sommet du tube d'un blanc-rosé ou verdâtre, hermaphrodites, actinomorphes (régulières) et possèdent 10 étamines (**Figure 3**). Le calice gamosépale possède 5 lobes courts. La corolle gamopétale de 5 à 7 mm de longueur, forme un petit grelot de couleur blanchâtre qui devient caduque avant la fanaison de la fleur pendant la

période d'août à septembre, elles sont une source significative de nectar et pollen pour les abeilles (Boullard, 2001 ; Maleš et al., 2006 ; Gomes et al., 2011).

### I.1.5.3. Fruits et grains

Le fruit, appelé arbouse de 2 cm de diamètre, jaunes puis rouge orangé à maturité. Ils mettent un an pour arriver à maturité (les baies à 5 loges sont mûres un an après la floraison). C'est un fruit charnu, sphérique avec une peau rugueuse couverte de petites pointes coniques (Tubercules pyramidaux-coniques) (Figure 3). C'est un fruit comestible qui est mûr en hiver, on peut le consommer cru, cuit sous forme de confiture ou le faire fermenter pour produire une boisson alcoolisée. A l'intérieur du fruit, les cinq loges contiennent 4 ou 5 petites graines jaunâtres (les pépins) riches en lipides (Tonelli et Gallouin, 2013).



**Figure 3.** Fleurs <sup>(a)</sup> et fruits d'*A.unedo*: <sup>(b)</sup> immature, <sup>(c)</sup> mature (Takrouni et Boussaid, 2010 ; Tonelli et Gallouin, 2013)

### I.1.6. Composition biochimique de fruit d'*A. unedo*

#### I.1.6.1. Composés chimiques et nutritifs

La composition des fruits d'*A.unedo* a été déterminée (Tableau 2). L'humidité est le composant le plus important de ces fruits et représente plus de 50% de poids du fruit frais, suivi des glucides (40%). En fait, ces fruits sont riches en différents glucides, soit des monosaccharides (fructose et glucose), des disaccharides (saccharose) et des polysaccharides (cellulose et amidon), de plus, les protéines sont le deuxième macronutriment majeur. En outre, l'arbouse représente une très bonne source de quelques minéraux, en particulier le potassium, le calcium et le phosphore (Ayaz et al., 2000 ; Özcan et Hacisferogullari, 2007 ; Barros et al., 2009 ).

Concernant la matière grasse, l'acide  $\alpha$  - linoléiques (36,51%), l'acide linoléiques (21,50%) et l'acide oléique (21,01%) sont les acides gras insaturés prédominants, et l'acide palmitique (8,20%) représente l'acide gras saturé le plus important (**Barros et al., 2010**).

La quantité de vitamines et de caroténoïdes dans les fruits, bien qu'elle ne soit pas très élevée, ne doit pas être ignorée. La teneur totale en vitamine E a été déterminée par **Barros et al. (2010)**, montrant que les fruits renferment dans leur composition  $23,46 \pm 0,26$  mg de tocophérols totaux par 100 g de poids sec, l' $\alpha$ -tocophérol, la forme la plus importante de vitamine E était de  $21,98 \pm 0,18$  mg / 100 g de poids sec. L'isomère  $\alpha$ -tocophérol a également été quantifié dans un autre travail (**Pallauf et al., 2008**). Une autre vitamine a déjà été trouvée dans les baies de l'arbousier, la vitamine C dont sa concentration peut atteindre 550 mg d'acide ascorbique pour 100 g de matière sèche du fruit (**Alarcão-e-Silva et al., 2001**).

L'analyse des composés volatiles des fruits d'arbousier a prouvé que les alcools sont les principaux composés détectés aux trois étapes de maturation, suivi des aldéhydes et des esters (**Owen et al., 1997**). Les acides organiques tels que les acides fumarique, lactique, malique, subérique et citrique ont été aussi identifiés (**Ayaz et al., 2000**).

L'énergie de ces fruits est apportée essentiellement par les glucides, d'autre part, la richesse relative des graines en lipides (40%) permet d'extraire une huile d'arbose (**Tonelli et Gallouin, 2013**).

**Tableau 2.** Composition chimique et nutritionnelle du fruit d'*A. unedo* (g/kg)

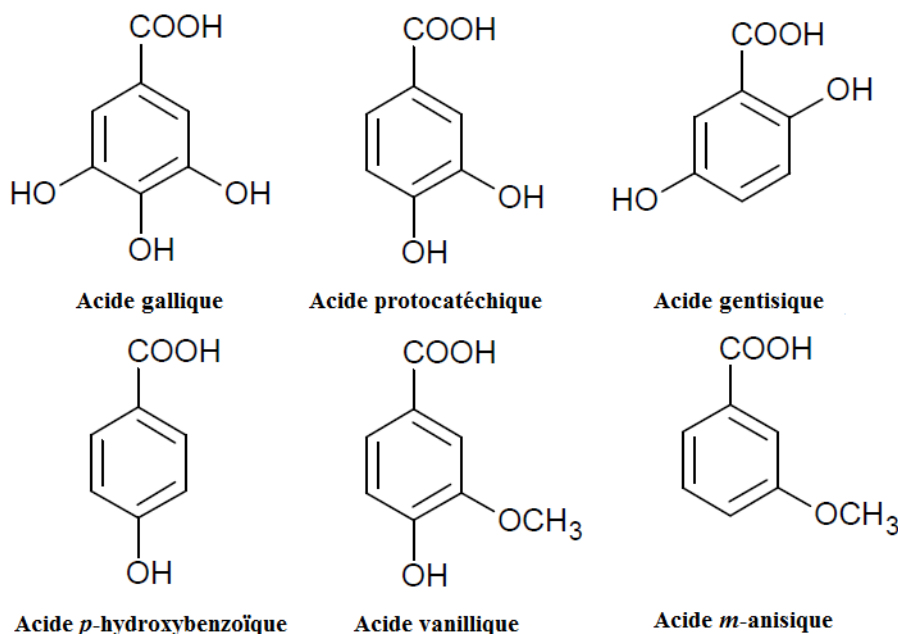
Composés	Özcan et Haciseferogullari (2007) *	Barros et al. (2009)*	Boussalah (2018) *
<b>Humidité</b>	537,2 $\pm$ 21,0	597,0 $\pm$ 26,7	637,3 $\pm$ 33,8
<b>Carbohydrates</b>	-	938,3 $\pm$ 4,1	134,0 $\pm$ 10,7
<b>Protéines</b>	33,6 $\pm$ 1,2	30,9 $\pm$ 0,8	35,5 $\pm$ 2,1
<b>lipides</b>	21 $\pm$ 1,0	13,7 $\pm$ 4,0	8,8 $\pm$ 0,5
<b>Cendre</b>	28,2 $\pm$ 1,24	17,1 $\pm$ 0,9	5,3 $\pm$ 0,3
<b>Energie</b>	13682 $\pm$ 544 kJ	16735,6 $\pm$ 48,9 kJ	-

- : non reporté, \* : exprimé par kilogramme de poids sec

### I.1.6.2. Composés phénoliques

Les résultats des recherches sont très contradictoires et se diffèrent selon les auteurs et l'origine du fruit. Dans les fruits d'*Arbutus*, plusieurs composés appartenant aux différents groupes de phénols ont été identifiés à savoir les acides phénoliques, les flavonols, les dérivés de flavan-3-ols et de galloyl, et les anthocyanines (**Ayaz et al., 2000 ; Pallauf et al., 2008 ;**

Mendes et al.,2011 ; Pimpão et al., 2013). En outre, certaines recherches ont démontré que l'acide gallique est le composé phénolique principal du fruits d'*Arbutus*, suivi de l'acide protocatéchique, acide gentisique, l'acide *p* –hydroxybenzoïque, l'acide vanillique et l'acide *m* –anisique (Ayaz et al.,2000) . Tandis que, d'autres ont trouvé que les principaux composés phénoliques sont les dérivés de flavan-3-ols et de galloyl suivi par les anthocyanines et les flavonols (Figure 4) (Guimarães et al., 2013).



**Figure 4.** Quelques composés phénoliques présents dans le fruit d'*A. unedo* (Miguel et al., 2014).

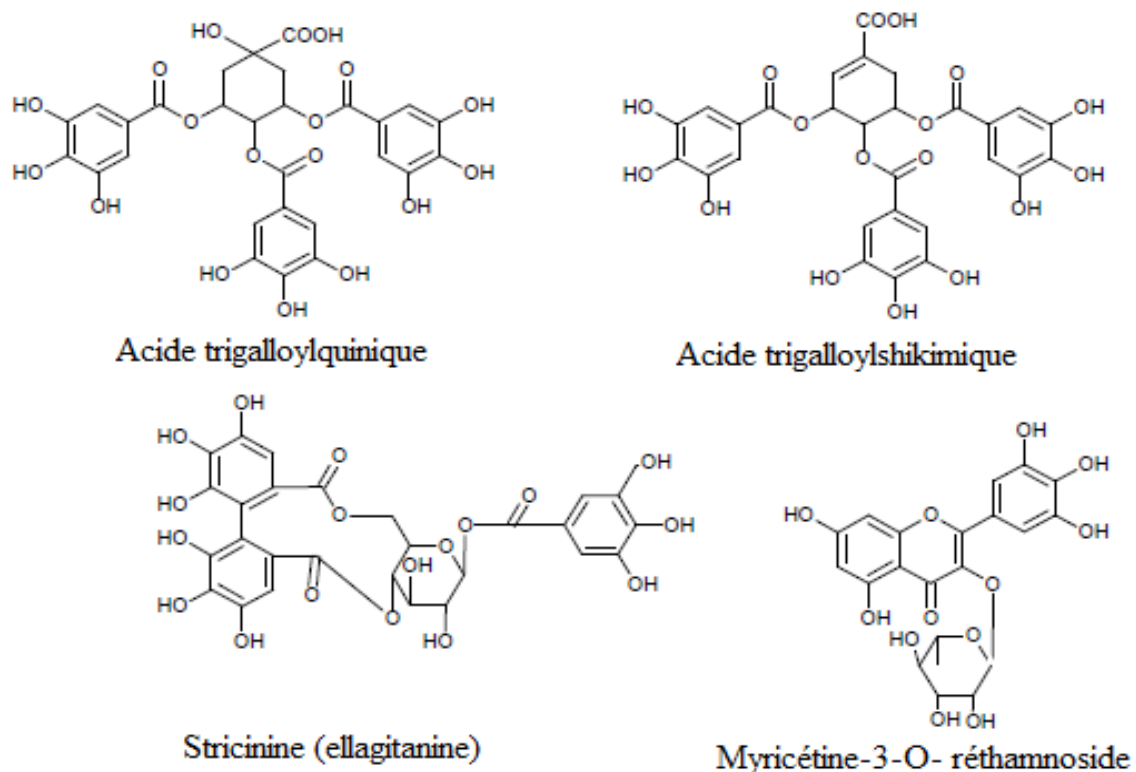
Après séparation par HPLC et sur la base d'une identification spectrale, les composés phénoliques des fruits d'arbousiers à pleine maturité de la région de Cáceres (Espagne) ont été divisés en catéchine et procyanidine, acides hydroxybenzoïques, acide ellagitanins, acide ellagique, acideshydroxycinnamiques, flavonols et des anthocyanes (Ganhão et al., 2010).

Les principaux composés phénoliques présents dans les fruits sauvages du Nord-Est du Portugal étaient les flavan-3-ols et les dérivés du galloyle, suivis par les anthocyanes et les flavonols (Guimarães et al., 2013).

Au sein du groupe de flavan-3-ols et de dérivés de galloyle, les fruits avaient le dimère B1, trimères de proanthocyanidine de type B, tétramère de procyanidine de type B, dimère de procyanidine de type B, acide galloylquinique, acide galloylhexoside, acide galloylshiquimique, catéchine, acide digalloylquinique, acide digalloylquinique shikimique et

stricinineellagitannine. De plus, le delphinidin-3-O-glucoside, le cyanidin-3-O-glucoside et le cyanidin-3-O-pentoside étaient les anthocyanes identifiées et quantifiées par les auteurs dans les fruits d'arbousier du nord-est du Portugal (Guimarães *et al.*, 2013).

En 2010, Fortalezas et ses collaborateurs ont travaillé sur les fruits d'*A. unedo* collectés du Parc Naturel de Montesinho (Bragança, Nord-Est du Portugal) et ils ont identifié plusieurs composés phénoliques par HPLC-DAD / ESI-MS. Il s'agit des composés suivant: glucoside d'acide gallique, acide galloylquinique, dérivé d'acide quinique, dimère de proanthocyanidine, acide galloylshikimique, acide digalloylquinique, acide digalloylshikimique, monomère de catéchine, proanthocyanidine trimère, stricinineellagitanine, dérivé d'ellagitannine, dérivé galloyl, acide trigalloylshikimique, myricétineréthannoside, myricétine acide réthannoside (Figure 5).



**Figure 5.** Quelques structures de dérivés de galloyl, tanins et flavonols présent dans le fruit d'*A. unedo* (Miguel *et al.*, 2014).

Certains anthocyanes trouvés dans les fruits d'origine Espagnol étaient différentes de celles trouvées au Portugal. Ils contenaient du delphinidin-3 galactoside, du cyanidin-galactoside, du cyanidin-glucoside et du cyanidinarabinoside. Au-delà des différences qualitatives entre les



fruits du Portugal et d'Espagne, des différences quantitatives peuvent également être détectées. Ces différences peuvent être attribuées aux différentes méthodes de quantification (Pallauf et al., 2008).

Les tannins avec les autres composés phénoliques, contribueraient au goût amer du fruit. Parmi les anthocyanines, la cyanidine a été identifiée comme étant le principal, contribuant à la couleur rouge caractéristique du fruit. D'autres flavonoïdes ont été identifiés comme, l'anthocyanine delphinidine-galactoside et les flavonols, quercetine et kaempferol (Pallauf et al., 2008).

### I.1.6.3. Influence du stade de maturation sur la composition du fruit

La maturation des fruits résulte d'un ensemble des phénomènes déterminant les qualités organoleptiques (odeurs, saveurs, consistances) ; sensations qui conditionnent le plaisir de consommer les fruits, en effet, lors des processus de maturation, de nombreuses molécules sont synthétisées dans le fruit à savoir les acides, les sucres, les vitamines, les fibres, les pigments, les antioxydants et les molécules odorants et sapides. En outre, certains fruits peuvent être récoltés avant maturité complète, car ils continuent à évoluer quand ils sont sevrés de l'arbre nourricier; ce sont les fruits climactériques (ou climatériques), c'est le cas des fruits d'arbousier qui peuvent accomplir leur maturation après moisson. D'abord les fruits sont vert lavé de rose, ils passent au jaune puis l'orange et enfin au rouge carmin où ils deviennent mous, fades et farineux (Tonelli et Gallouin, 2013).

La quantité de sucres dans le fruit d'*A.unedo* est variable entre les stades de maturation, elle est de 140 g/kg de poids sec dans le fruit non mûr et 405,5 g/kg de poids sec au stade final de maturité, de plus, le sucre le plus abondant dans le fruit immature est le saccharose tandis que le fructose devient le sucre majeur présent dans ces fruits mûrs (Alarcão-E-Silva et al., 2001).

Les acides gras polyinsaturés représentent 52,47% des acides gras au stade non mature et à environ 62,01% dans les fruits mûrs, en effet, l'acide gras  $\alpha$  - linoléique (C18:3n3) représente 36,51% dans les fruits immatures et 43,07 % dans les fruits mûrs (Barros et al., 2010 ; Oliveira et al., 2011). La vitamine C est présente à des concentrations qui varient de 89 mg/100 g au stade immature à 346 mg/100 g dans les fruits rouge mûr (Mariotto et al., 2008 ; Fortalezas et al., 2010).

Les caroténoïdes sont également présents dans ces fruits, en particulier la  $\beta$  - carotène, la quantité de cette dernière varie pendant la maturation. Elle passe de 381 mg/kg de poids sec

quand le fruit est vert, à 709 mg /kg du poids sec quand le fruit est rouge (**Alarcão-e-Silva et al., 2001**).

Les composés phénoliques totaux ont été quantifiés par plusieurs chercheurs, en effet, **Oliveira et al. (2011)** ont déterminé un contenu maximal de 48,26 g EAG / kg d'extrait au stade intermédiaire de maturation. D'autre part, la quantité d'anthocyanines s'est avérée augmenter pendant la maturation, elle est de 0,25 g/kg du poids sec quand le fruit est immature et de 1,01g/kg de poids sec lorsque le fruit devient rouge. Cependant, la teneur des tannins diminuée lors de la maturation, elle passe de 3,13 g/kg du poids sec quand le fruit est vert à 1,75 g/kg de poids sec au stade mature, c'est pourquoi les fruits verts sont caractérisés par un goût trop astringent (**Alarcão-e-Silva et al., 2011**).

La concentration des composés volatiles diminuait pendant la maturation, à l'exception des sesquiterpènes et des monoterpènes qui ont montré des concentrations plus élevées dans les fruits mûrs que dans les fruits immatures (**Kahriman et al., 2010**). Une diminution du contenu des composés responsables de l'odeur caractéristique de fruit vert (alcools, aldéhydes et esters) s'est avérée liée à une augmentation des teneurs des composés liés à la flaveur et le parfum doux (principalement monoterpènes et norisoprenoids) présent dans les fruits mûrs (**Owen et al., 1997**).

#### **I.1.1.7. Propriétés biologique du fruit d'*A. unedo***

Plusieurs espèces d'*Arbutus* ont été étudiées pour leurs propriétés biologiques, notamment les activités antitumorales, anti-hypertensives, antimicrobiennes, hypoglycémiques, hypocholestérolémiques, cardiovasculaires, anti-inflammatoires, anti-diarrhéiques, antioxydantes et antidiabétiques (**Pallauf et al., 2008 ; Fortalezas et al., 2010; Mendes et al., 2011; Moualek et al., 2016 ; Ben salem et al., 2018**).

Ici, nous rapportons les principales activités étudiées utiles pour une utilisation potentielle des fruits d'*A.unedo*.

##### **I.1.7.1. Activité antioxydante**

Des extraits de fruits d'*A. unedo* ont démontré une activité antioxydante intéressante *in vitro*. Plusieurs facteurs, dont l'origine géographique, le processus d'extraction, la maturation des fruits et la transformation ont influencé cette activité (**Tenuta et al., 2018**).

Durant la période de maturation, le fruit mature présente la plus haute activité antioxydante mesurée par différentes méthodes (piégeage du radical libre DPPH, blanchiment du  $\beta$ -carotène, réduction du fer et le piégeage de l'anion super-oxyde) (Isbilir et al., 2012).

Cette capacité antioxydante ne dépend pas seulement des teneurs en phénol et en flavonoïdes, mais également à d'autres molécules présentes comme la vitamine C. Elle est influencée aussi par le processus de séchage. En effet, les fruits soumis à la lyophilisation avaient un radical DPPH et une prévention à la peroxydation lipidique évaluée par le test du blanchiment au  $\beta$ -carotène plus élevés que celui soumis au séchage à l'air chaud (Orak et al., 2012). Cette preuve peut être expliquée en considérant que la température élevée utilisée dans le séchage à l'air chaud peut être responsable de la dégradation et / ou de la perte de composés antioxydants comme les phénols et l'acide ascorbique (Demirsoy et al., 2007).

L'un des phénols d'*A. unedo* les plus importants est l'acide homogentisique (acide 2,5-dihydroxyphénylacétique) qui a montré des activités antioxydantes et anti radicalaire intéressantes par différents mécanismes d'action (Kang et al., 2005; Rosa et al., 2011).

#### I.1.7.2. Activité antimicrobienne

Dans la littérature, il n'y a que peu d'études sur l'activité antimicrobienne du fruit d'*A. unedo*. Ben salem et al. (2018) ont décrit la méthode de diffusion sur disque de l'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique de fruits. Ils ont montré une activité antimicrobienne intense contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa*, une activité modérée contre *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium* et *Candida albicans*, et une faible activité contre la souche de *Streptococcus*.

En outre, les extraits hydro-alcooliques de ce fruit possédaient une forte activité antifongique contre *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus* et *Cladosporium cladosporioides*. Une corrélation positive entre la catéchine et la croissance de champignon a été trouvée (Takwa et al., 2018).

Par ailleurs, l'huile essentielle des fruits a montré une activité antibactérienne modérée contre *Listeria monocytogenes* et *Enterococcus faecalis* (Kahriman et al., 2010).

#### I.1.7.3. Activité antiproliférative

Les fractions polyphénoliques des fruits d'*A. unedo* ont montré des valeurs d'IC50 similaires à celles obtenues pour les contrôles positifs utilisés comme la mûre et le thé vert. Les dérivés de

l'acide gallique sont les principaux constituants des fruits qui ont démontré une grande variété d'activités biologiques, y compris anticancéreuse (Fiuza et al., 2004).

Des études ont démontré que les extraits éthanolique des fruits d'*A. unedo* inhibaient la synthèse d'ADN et la prolifération cellulaire dans différentes lignées cellulaires cancéreuses. L'extrait enrichi en anthocyanes a montré son efficacité contre cinq cellules cancéreuses humaines à savoir l'adénocarcinome du sein, le carcinome hépatocellulaire, le carcinome du côlon, le carcinome du poumon et le carcinome du col de l'utérus. Cette activité pourrait être corrélée à la présence de dérivés du galloyle présent dans cette espèce (Schaffer et al., 2005 ; Guimarães et al., 2014).

### I.1.8. Utilisation du fruit d'*A. unedo*

#### I.1.8.1. Utilisations alimentaires

- **Boissons**

Les boissons sont obtenues par la distillation des fruits fermentés d'*A. unedo*, elles sont connues dans plusieurs pays sous différents noms. Au Portugal, cette boisson distillée est connue par le nom "aguardente de medronho", en Italie "Corbezzolo", et en Grèce "Koumaro". Cette boisson est riche en alcools, en esters, en acides et en composés aromatiques, d'autre part, le calcium est le minéral principal dans ce produit. La qualité de cette boisson peut être affectée, en effet, elle est caractérisée par des mauvais goûts lorsque la fermentation est mal contrôlée (Soufleros et al., 2005 ; Cavaco et al., 2007 ; Santos et al., 2012).

- **Utilisations culinaire**

On peut manger les arbouses crues. Au XIX siècle, les fruits étaient vendus sur les marchés Parisiens pendant l'hiver, apportant une source de vitamine C quand le choix en fruits était plus limité (Tonelli et Gallouin, 2013).

En raison de sa richesse en pectines, l'arboise est aussi utilisée dans la production de gelées, confitures, marmelades, des yaourts, et autres desserts traditionnels. Il est également incorporé dans les produits céréaliers, les produits à base de viande et pour la garniture de pâtisserie. Le fruit sec est utilisé pour faire du thé, des saveurs et couleurs dans l'industrie (Pawlowska et al., 2006; Demirsoy et al., 2007; Pallauf et al., 2008).

En Espagne, ils ont fait un sorbet à la pulpe d'Arboise et, en Corse, du fait de sa saveur aigre-douce, elle accompagne certains plats salés et la pulpe fermentée donne un vin d'arboise que

l'on peut mener en fermentation acétique pour obtenir un vinaigre (Tonelli et Gallouin, 2013).

En Algérie, ce fruit est consommé cru. Il possède une très légère toxicité : consommé cru en trop grande quantité, il peut induire des coliques bénignes (Doukani et Tabak, 2014).

### I.1.8.2. Utilisations en technologie alimentaire

La capacité antioxydante des fruits d'arbousier a conduit à l'application de leurs extraits riches en composés phénoliques comme ingrédients fonctionnels dans les produits carnés transformés. A titre d'exemple, la combinaison d'extraits de fruits avec l'ascorbate de sodium et le nitrite de sodium améliore la stabilité à l'oxydation des saucisses de Francfort sans modifier leurs propriétés de couleur et de texture en minimisant la détérioration de la qualité pendant le stockage réfrigéré (Armenteros et al., 2013 ; Ganhão et al., 2013).

L'ajout d'extrait de fruit dans la viande porcine a protégé les acides gras polyinsaturés de la dégradation oxydative, a inhibé la formation de substances réactives à l'acide thiobarbiturique et de composés volatils, il a protégé aussi contre l'oxydation des protéines tout en empêchant la formation de composés carbonylés. Ainsi, les propriétés nutritionnelles et sensorielles de ces produits ont été améliorées (Ganhão et al., 2010 ; Ganhão et al., 2013).

D'autres applications des extraits de fruits d'*A. unedo* dans la technologie alimentaire ont été rapportés, comme l'enrichissement des yaourts avec de l'extrait de ce fruit qui a amélioré l'activité antioxydante et la survie de son communauté microbienne, n'affectant pas les caractéristiques chimiques et microbiologiques des yaourts (Cossu et al., 2009).

Plus récemment, des essais sur l'incorporation de l'extrait de fruit d'arbousier riche en catéchine dans le pain ont démontré une capacité antioxydante plus élevée que les pains incorporés avec de l'acide ascorbique et du sorbate de potassium. Cela encourage le remplacement des conservateurs synthétiques par d'autre naturelle, sans interférer avec les caractéristiques nutritionnelles (Takwa et al., 2017).

En outre, l'extrait de ce fruit considéré comme un ingrédient fonctionnel dont son incorporation dans un fromage à pâte molle «Sardaigne», conduit à l'augmentation du son rendement et l'amélioration de son activité de piégeage du DPPH au cours du stockage tout en conservant sa couleur et ses propriétés sensorielles (Masmoudi et al., 2020).

### I.1.8.3. Utilisations médicales

Les arbouses sont traditionnellement utilisées pour le traitement de différentes maladies dans plusieurs régions méditerranéennes comme l'Italie, le Maroc et la Turquie. Plusieurs études in vitro et précliniques menées avec des extraits d'*A. unedo* soutiennent diverses utilisations populaires en médecine traditionnelle à savoir dans le traitement des troubles gastro-intestinaux, des problèmes dermatologiques et urologiques et pour des applications cardiovasculaires et des gastrite (**Leonti et al., 2009**).

Les fruits possèdent des propriétés anti-diarrhéiques et astringentes. Ils contiennent de la pectine qui, avec les tannins, les rend idéales pour préparer une tisane de fruits qui apporte des bienfaits en cas de diarrhée. **Boullard (2001)** souligne la nécessité de respecter les doses d'arbouses consommées car elles sont anti-diarrhéiques en petite quantité, et deviennent purgatives en grande quantité.

# **Chapitre 2**

## Emballage actif et conservation des aliments

### I.2.1. Emballage actif

L'emballage actif est un concept innovant qui peut être défini comme un mode d'emballage dans lequel l'emballage, le produit et l'environnement interagissent pour prolonger la durée de conservation ou améliorer la sécurité ou les propriétés sensorielles, tout en maintenant la qualité du produit (**Prasad et Kochhar, 2014**).

Les systèmes d'emballage actifs prolongent la durée de conservation des produits alimentaires en maintenant leur qualité plus longtemps, augmentent leur sécurité en protégeant les aliments contre les agents pathogènes et le bioterrorisme et améliorent la commodité de la transformation, de la distribution, de la vente au détail et de la consommation des aliments (**Han, 2005**).

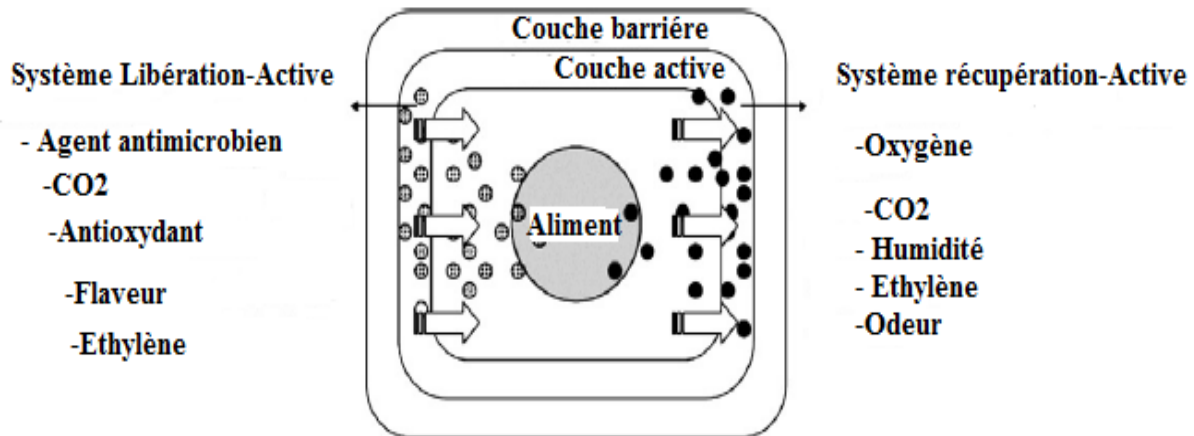
Un agent actif peut être incorporé à l'intérieur du matériau d'emballage ou sur sa surface, dans des structures multicouches ou dans des éléments particuliers associés à l'emballage tels que des sachets supplémentaires, des étiquettes ou des bouchons de bouteilles. La nature des agents actifs pouvant être ajoutés est très variée (acides organiques, enzymes, bactériocines, fongicides, extraits naturels, ions, éthanol, etc.) ainsi que la nature des matériaux dans lesquels ils sont inclus (**Murgic et al., 2015**).

### I.2.2. Systèmes des emballages actifs

Ces systèmes d'emballage peuvent être classés selon leur fonction. Plusieurs composés actifs peuvent être ajoutés à des mélanges de films ou des emballages. Ces ingrédients actifs peuvent être des agents antimicrobiens, des arômes, des pigments, des métaux, des nutriments et des antioxydants. Pendant le processus de mélange, les groupes fonctionnels du matériau pourraient être liés aux composés actifs dans la matrice (**Aguirre-Joya et al., 2018**).

Les systèmes d'emballage actif peuvent être divisés en systèmes de libération-active (émetteurs) ajoutant des composés dans l'espace de tête ou aux aliments emballés et en systèmes de récupération-active (absorbeurs) éliminant les composés indésirables de l'aliment ou de son environnement (figure 6) (**Yildirim et Röcker, 2018**).





**Figure 6.** Systèmes de l'emballage actif (Yildirim, 2011).

### I.2.2.1. Capteurs d'oxygène

La présence d'oxygène, si elle n'est pas souhaitée, peut résulter d'une évacuation inadéquate ou insuffisante au cours du processus d'emballage, de la présence dans l'aliment lui-même ou le matériau d'emballage et sa libération dans l'espace de tête, la perméation à travers l'emballage, l'introduction d'air en raison d'une mauvaise étanchéité, ou micro perforations dans les matériaux d'emballage. Un niveau élevé d'oxygène réduit la valeur nutritive des aliments et réduit leur durée de conservation (Mohan et al., 2008).

D'autre part, l'oxygène libre réagit avec les aliments sensibles dans l'emballage et accélère la détérioration de nombreux produits alimentaires par la dégradation des vitamines, le rancissement des matières grasses, et la stimulation de la croissance microbienne (Mohan et al., 2008).

L'application de capteurs d'oxygène, est l'un des principales technologies d'emballage actif qui visent à éliminer tout résidu d'oxygène présent dans l'emballage alimentaire ou améliorer ses propriétés en agissant comme une barrière active (Arvanitoyannis et Oikonomou 2012 ; Sangerlaub et al., 2013a).

Les systèmes d'absorption d'oxygène typiques sont basés sur l'oxydation de poudre de fer par des moyens chimiques ou par piégeage de l'oxygène grâce à l'utilisation d'enzymes. Dans le premier cas, le fer conservé dans un petit sachet est oxydé en oxyde de fer. Ces systèmes d'absorption d'oxygène à base de fer ont la capacité de piéger l'oxygène dans de nombreux aliments, y compris les aliments à une teneur en eau élevée, et les aliments contenant des lipides. Ils peuvent également fonctionner dans des conditions de stockage réfrigérées et

congelées, et ils peuvent être utilisés comme piègeur d'oxygène efficace, même avec les produits alimentaires destinés aux usages micro-ondes. Dans les systèmes de piégeage enzymatique de l'oxygène, une enzyme réagit avec un substrat pour piéger l'oxygène. Ces systèmes sont plus chers que les systèmes à base de fer, en raison du coût des enzymes utilisées. Ils sont généralement très sensibles à la température, au pH, à l'activité de l'eau et au solvant / substrat présents dans le sachet, limitant ainsi leur utilisation (**Ozdemir et Floros, 2004**).

#### **I.2.2.2. Capteurs et émetteurs de dioxyde de carbone**

Des niveaux élevés de dioxyde de carbone jouent généralement un rôle bénéfique en retardant la croissance microbienne sur les surfaces de viande et de volaille et en retardant le rythme respiratoire des fruits et légumes. Étant donné que le dioxyde de carbone est plus perméable que l'oxygène à travers de nombreux films plastiques utilisés pour l'emballage des aliments (**Ozdemir et Floros, 2004**).

Dans les cas où l'emballage a une perméabilité élevée au dioxyde de carbone, un système émettant du dioxyde de carbone peut être nécessaire pour réduire la vitesse de respiration et supprimer la croissance microbienne. La mise en œuvre d'émetteurs de CO<sub>2</sub> dans les emballages peut ainsi permettre un degré de remplissage accru, des tailles d'emballage réduites, une efficacité de transport améliorée et une réduction nette de l'impact environnemental (**Ozdemir et Floros, 2004 ; Holck et al., 2014**).

Cependant les systèmes de piégeage du dioxyde de carbone sont très utiles pour les produits qui nécessitent des processus de fermentation et de vieillissement après avoir été emballés (**Han, 2005**).

L'utilisation d'un système à double fonction composé d'un capteur d'oxygène et d'un émetteur de dioxyde de carbone est la pratique habituelle pour augmenter la durée de conservation des aliments hautement périssables (**Ozdemir et Floros, 2004**).

#### **I.2.2.3. Capteur d'humidité**

Les systèmes « capteurs d'humidité » sont utilisés depuis très longtemps pour emballer les aliments secs, les aliments sensibles à l'humidité et les produits pharmaceutiques. Dans ces systèmes, les matières déshydratantes sont incluses dans l'emballage sous la forme d'un sachet pour contrôler plus spécifiquement l'humidité à l'intérieur de l'emballage. Ces systèmes basés

sur la dessiccation évoluent pour contrôler l'humidité en maintenant une humidité relative spécifique à l'intérieur de l'emballage en absorbant ou en libérant l'humidité (**Han, 2005**).

Les capteurs d'humidité les plus connus sont le gel de silice, les tamis moléculaires, les argiles naturelles, l'oxyde de calcium, le chlorure de calcium et l'amidon ou d'autres substances absorbant l'humidité. Le gel de silice est le plus utilisé car il est non toxique et non corrosif (**Ozdemir et Floros, 2004**).

Une couverture déshydratante est généralement enroulée autour des aliments à conserver comme les viandes, les volailles, les poissons ou les crustacés pour absorber l'eau. Une autre approche pour absorber l'humidité de ces aliments consiste à utiliser un film stratifié composé d'un polymère super-absorbant. En outre, les systèmes absorbant l'humidité sous forme de sachet sont généralement utilisés pour maintenir de faibles niveaux d'humidité dans les emballages d'aliments secs, tels que les croustilles, les noix, les épices, les biscuits, les craquelins, le lait en poudre et le café instantané (**Ozdemir et Floros, 2004**).

#### **I.2.2.4. Emballage antioxydant**

L'emballage actif représente une stratégie innovante pour incorporer des antioxydants dans une matrice polymère pour prévenir les processus oxydatifs et prolonger la durée de conservation des produits alimentaires (**Realini et Marcos, 2014**).

Ces dernières années, le développement d'emballages libérant des antioxydants pour des applications alimentaires a augmenté. Les antioxydants synthétiques, tels que l'hydroxytoluène butylé (BHT) et l'hydroxyanisole butylé (BHA) ont été largement utilisés dans les emballages alimentaires pour empêcher l'oxydation des lipides. Il y a maintenant un intérêt croissant pour l'inclusion d'antioxydants naturels tels que les polyphénols, les tocophérols, les extraits de plantes et les huiles essentielles, dans les matériaux d'emballage actifs (**Yildirim et al., 2018**).

Nombreuses plantes sont des sources potentielles d'antioxydants naturels, telles que les légumes, les fruits, les herbes, les feuilles et les épices. Ces antioxydants comprennent les caroténoïdes, l'acide ascorbique, les flavonoïdes et d'autres composés phénoliques (**Sánchez-González et al., 2011**).

Cependant, l'utilisation de ces composés présente certains inconvénients, tels qu'une faible solubilité, une sensibilité à la température et à la dégradation par la lumière, la volatilité et les arômes indésirables, qui entraînent une perte de fonctionnalité, limitant ainsi leur application (**Fang et Bhandari, 2010**).

Par conséquent, l'ajout de composés antioxydants naturels provenant de sources naturelle à des films d'emballage peut résoudre efficacement ces problèmes. Un emballage actif pourrait permettre la libération d'antioxydants pendant le stockage ainsi que la distribution, évitant la détérioration des aliments (par exemple, l'oxydation des lipides), augmentant la durée de conservation des aliments et empêchant la perte de qualité sensorielle et nutritionnelle **(Ramos et al., 2018)**.

En outre, l'un des plus importants caractéristiques à considérer pendant l'ajout des antioxydants dans la formulation est la solubilité, qui peut déterminer son efficacité dans la matrice, il est donc essentiel de savoir que ces composés doit être sélectionné en fonction du type d'aliment. De cette façon, les antioxydants polaires conviennent mieux aux aliments à haute teneur en lipides **(Gómez-Estaca et al., 2014)**.

#### **1.2.2.5. Emballage antimicrobien**

L'application de substances antimicrobiennes dans les emballages actifs a reçu beaucoup d'attention de l'industrie alimentaire pour améliorer la sécurité microbienne des produits alimentaires. Cet intérêt est principalement attribué à la demande croissante des consommateurs pour des produits alimentaires plus naturels et moins transformés **(Campos et al., 2010)**.

L'emballage actif antimicrobien interagit avec les aliments emballés afin de réduire, retarder ou même inhiber la croissance de micro-organismes d'altération ou pathogènes. Il peut prendre plusieurs formes, notamment l'incorporation directe du composé bioactif dans la matrice polymère, son revêtement sur la surface de l'emballage ou son immobilisation dans des sachets **(Nguyen Van Long et al., 2016)**.

L'emballage antimicrobien peut être classé en trois types ; des systèmes libérant des agents antimicrobiens, tels que des acides organiques, du matériau d'emballage à la surface de l'aliment où ils se diffusent, ces systèmes nécessitent un contact alimentaire direct. Des systèmes libérant des agents antimicrobiens volatils, tels que des extraits d'épices et d'herbes, du matériau d'emballage dans l'espace de tête de l'emballage d'où ils sont absorbés par les aliments, ces systèmes ne nécessitent pas de contact direct avec les aliments et enfin des polymères antimicrobiens non migrateurs avec un agent antimicrobien attaché au squelette du polymère, dans ces systèmes, le contact alimentaire est nécessaire **(Yildirim et Röcker, 2018)**.

Ce type d'emballage pourrait faciliter le contrôle de la croissance des micro-organismes d'altération, une fois qu'ils sont en contact direct avec la surface des aliments. De plus, les emballages antimicrobiens ont la capacité de maintenir des concentrations élevées de composés bioactifs à la surface des aliments, donc d'éviter la réduction de l'efficacité ou la migration rapide des composés dans le vrac s'ils sont appliqués directement aux aliments par trempage ou pulvérisation (**Rhim et Ng, 2007**).

Les agents antimicrobiens utilisés dans les films peuvent être des acides organiques, des métaux, de chitosane, des esters d'acide, des lysozymes, des antibiotiques, des bactériocines, des enzymes, des agents chélateurs, etc. (**Ozdemir et Floros, 2004**). De plus, la tendance de préférence des consommateurs a évolué vers des produits alimentaires naturels et sans additifs; les scientifiques ont donc recherché certains additifs naturels tels que l'huile essentielle et les extraits de plantes ou la nisine de bactéries pour assurer la salubrité et la sécurité des aliments (**Sohaib et al., 2016**).

L'ajout d'agent antimicrobien volatil comme les huiles essentielles dans les emballages est une autre application de la technologie d'emballage actif qui attire l'attention en raison de l'absence de contact entre les aliments et l'agent antimicrobien résultant aucun impact sur les propriétés sensorielles des produits alimentaires (**Kapetanakou et al., 2014**).

Les emballages comestibles, lorsqu'ils sont incorporés avec des composés antimicrobiens, ont le potentiel d'être utilisés comme emballage actif antimicrobien pour contrôler les agents pathogènes d'origine alimentaire et les micro-organismes d'altération, améliorant ainsi la sécurité sanitaire des aliments. L'action sélective de tels films consiste à libérer lors du stockage des aliments une substance active appropriée qui affecte les micro-organismes (**Lopez – Rubio et al., 2006 ; Pérez Espitia et al., 2014**).

### **I.2.3. Les polymères naturels utilisés dans les emballages actifs**

Plusieurs alternatives, comme les biopolymères, ont été étudiées afin de réduire l'impact des plastiques sur l'environnement. Ces biopolymères comprennent les amidons, les dérivés de la cellulose, le chitosane, les gommes, les protéines d'origine animale ou végétale et les matières lipidiques utilisées pour produire des films minces et des enrobages pour couvrir les aliments frais ou transformés et prolonger leur durée de conservation (**Alak et al., 2010; Elsabee et Abdou, 2013**).

Les matières actives utilisées pour la préparation de l'emballage sont principalement non toxiques, utilisées comme matériaux de protection pour maintenir la qualité des aliments, ce qui satisfait la demande des consommateurs pour des denrées périssables peu traitées sans conservateurs chimiques (**Alak et al., 2010; Leceta et al., 2013**).

### **I.2.3.1. Gélatine**

La gélatine est une protéine naturelle soluble dans l'eau caractérisée par l'absence d'une odeur appréciable, elle est biodégradable et biocompatible et montre une capacité de gonflement et de gélification ainsi qu'une stabilité thermique (**Hashim et al., 2015; Patel et al., 2018**).

Elle est principalement produite par hydrolyse partielle du collagène trouvée principalement dans certaines parties des animaux vertébrés et invertébrés comme la peau et l'os de bovins et de porcins (**shankar et al., 2016**).

Cependant, ces dernières années, la gélatine dérivée de diverses espèces de poissons a été utilisée pour préparer des films actifs aux propriétés antioxydantes et / ou antimicrobiennes.

Des films et des enrobages comestibles à base de gélatine ont déjà été proposés pour protéger, maintenir ou prolonger la durée de conservation des produits alimentaires. Différents types d'additifs pourraient être ajoutés pour améliorer ou modifier les propriétés finales afin d'obtenir des films ou revêtements à base de gélatine pour emballages alimentaires (**Mellinas et al., 2016**).

En effet, l'incorporation de polyphénols extrait du henné, du thé ou des olives dans des gélatines de poisson s'est révélé prolonger la durée de conservation de la viande, du poisson et des fruits, respectivement (**Bermúdez-Oria et al., 2017 ; Feng et al., 2017 ; Jridi et al., 2018**).

Les huiles essentielles ont également été incorporés à la gélatine bovine pour inhiber la croissance des micro-organismes; en particulier celles de l'origan et de la lavande s'est avéré efficace contre les bactéries d'altération des aliments, en particulier les bactéries Gram positives (**Martucci et al., 2015**).

Certains antioxydants, tels que l'acide ascorbique a été incorporé dans des films de gélatine porcine et une libération contrôlée d'antioxydants du film a été observée (**Kowalczyk, 2016**).

De plus, l'incorporation l'extrait éthanolique de curcuma dans des films de gélatine porcine a entraîné des interactions entre les composés phénoliques et la gélatine, améliorant les propriétés de barrière à la lumière UV-vis des films de gélatine, en plus de l'amélioration de leur capacité antioxydante (**Bitencourt et al., 2014**).

### I.2.3.2. Amidon

L'amidon est un glucide complexe, potentiellement soluble dans l'eau, et le principal polysaccharide de réserve des plantes supérieures. Il est l'un des polysaccharides utilisés pour obtenir des films biodégradables en raison de sa capacité à former une matrice continue et de sa faible perméabilité à l'oxygène. En effet, des films d'amidon comestibles ou biodégradables peuvent être obtenus à partir de l'amidon natif ou de ses composants, l'amylose et l'amylopectine (Dole et al., 2004 ; Paes et al., 2008). L'amidon modifié, soluble ou pré-gélatinisé est également été utilisé pour obtenir des films d'amidon (López et al., 2008).

Un grand nombre de composants ont été ajoutés à la matrice, les films obtenus sont transparents, inodore, insipide et incolore, avec des bonnes barrière mécanique et propriétés optiques. Néanmoins, le phénomène de rétrogradation et la nature hautement hydrophile des films d'amidon limitent leur utilité. L'incorporation de certains additifs tels que des lipides, des hydrocolloïdes ou des agents de renforcement, peut résoudre ces problèmes dans une large mesure, donnant lieu à des matériaux plus stables avec des propriétés améliorées (Jiménez et al., 2012).

### I.2.3.3. Chitosane

Le chitosane est un matériau non toxique, biodégradable et biocompatible, composé d'unités glucosamine et N-acétyl glucosamine liées par des liaisons  $\beta$ -1, 4, glycosidiques. Il est produit par désacétylation de la chitine qui est présent dans divers organismes vivants. Leur propriétés de réagir avec les espèces chargées négativement peuvent être utilisées pour l'incorporation et / ou la libération programmée de composés actifs (Soares, 2009).

Les propriétés antioxydantes du chitosane ont été largement étudiées, bénéficiant à l'emballage de nombreux produits alimentaires dans des films de chitosane. Ces derniers peuvent porter des composants fonctionnels spécifiques, tels que des agents de conservation, des antimicrobiens, des antioxydants, des nutriments et des nutraceutiques dont leur utilisation dans l'industrie alimentaire peut augmenter la durée de conservation des aliments et également améliorer les caractéristiques générales des films (Moradi et al., 2012).

Le chitosane présente également des propriétés antimicrobiennes contre une grande variété de micro-organismes pathogènes et d'altération (Goy et al., 2009).

Les films à base de chitosane sont peu coûteux, transparents et perméables à la vapeur d'eau. Cependant, ils présentent une faible perméabilité au CO<sub>2</sub> et à l'O<sub>2</sub>, ne sont pas

thermoplastiques et ne peuvent pas être extrudés, moulés ou étirés comme de nombreux matériaux d'emballage conventionnels (Broek et al., 2015).

#### **I.2.4. Emballage actif et bioconservation des aliments**

La bioconservation fait référence à l'extension de la durée de conservation et à l'amélioration de la sécurité sanitaire des aliments en utilisant les ressources de la nature, y compris les ingrédients de la flore et de la faune et les micro-organismes et / ou leurs métabolites. Un certain nombre de techniques de conservation non traditionnelles sont en cours de développement commercial pour satisfaire la demande des consommateurs en ce qui concerne l'aspect nutritionnel des aliments (Gálvez et al., 2014).

Il a été démontré que de nombreux micro-organismes, animaux, plantes et ressources naturelles possèdent des propriétés antimicrobiennes et qu'ils présentent une forte coordination et constituent une partie de la défense contre diverses infections microbiennes en ce qui concerne l'inhibition et la destruction des colonies microbiennes (Gálvez et al., 2014).

Les emballages actifs destinés à la bioconservation des aliments utilisent des agents antimicrobiens ou des polymères présents dans la nature ou isolés de sources microbiennes, végétales ou animales. Les agents antimicrobiens produits par les micro-organismes comprennent les bactériocines telles que la nisine ou la pédiocine, les antibiotiques tels que la natamycine, les acides organiques tels que les acides sorbiques et les acides benzoïques ou des enzymes comme le lysozyme. Les agents antimicrobiens d'origine végétale comprennent des extraits d'herbes telles que le thym, l'origan.....etc et des huiles essentielles. Le chitosane est un exemple de polymère antimicrobien naturel obtenu par désacétylation de la chitine (Yildirim, 2011).



## **II. Matériel et Méthodes**

### II.1. Matériel biologique

#### II.1.1. Fruit d'*A. unedo*

Les fruits d'*A. unedo* de différents stades de maturation (vert (FV), jaune (FJ) et rouge (FR)) (Figure 7) ont été récoltés de la région de « Texenna » (750m d'altitude), située à 20 km du Sud de la wilaya de Jijel, Nord-Est d'Algérie durant la période de novembre à décembre des années 2014 à 2019. Les fruits ont été conservés par congélation dans des sacs isothermes jusqu'à leur utilisation.

Pour l'obtention de la poudre de fruit, les fruits congelés à différent stade de maturation ont été coupés en petits morceaux et séchés dans une étuve aérée (Memmert, Allemagne) à 37°C puis broyé en une poudre fine à l'aide d'un mixeur. Pour éviter l'oxydation des composés phénoliques, les échantillons séchés ont été conservés à 4°C à l'obscurité jusqu'à leur utilisation.



**Figure 7.** Echantillon des fruits d'*A. unedo* en trois stades de maturation

#### II.1.2. Sardine commune (*Sardina pilchardus*)

Afin de valider l'effet antibactérien de notre extrait et l'emballage actif préparé, la sardine commune, *Sardina pilchardus* a été utilisée. Le choix de la sardine comme matrice alimentaire repose sur le fait que ce poisson est de large consommation par la population Algérienne, cependant, il est très vulnérable aux altérations microbiennes. Les sardines (3kg, de longueur de  $10 \pm 2$  cm et largeur  $1,8 \pm 0,3$  cm) ont été fraîchement achetées du marché local d'Ain Smara, Constantine puis transportées dans des conteneurs réfrigérés au laboratoire pédagogique de l'institut de la nutrition, de l'alimentation et de technologies agro-alimentaire (INATAA), où elles ont été immédiatement éviscérées et rincées à l'eau distillée stérile et laissées égouttées.

## **II. Matériel et Méthodes**

---

### **II.1.3. Beurre traditionnel**

Le beurre traditionnel utilisé (1,5kg) pour le procédé de bioconservation est du beurre du lait de vache fraîchement préparé, acheté auprès d'un commerçant dans la wilaya de Khenchela.

### **II.1.4. Souches cibles**

Pour la détermination de l'activité antimicrobienne des extraits des fruits d'*A. unedo*, nous avons utilisé huit souches bactériennes fournies par le laboratoire de microbiologie de l'université de Bejaia et qui sont :

- ✓ *Listeria monocytogenes* ATCC 25922;
- ✓ *Klebsiella oxytoca* ATCC 25922;
- ✓ *Escherichia coli* ATCC 25922;
- ✓ *Bacillus subtilis* ATCC 21332;
- ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC25923;
- ✓ *Salmonella* sp: souche sauvage isolée des œufs de poulet ;
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853;
- ✓ *Acinetobacter baumannii* ATCC19606.

De plus quatre souches fongiques fournis par le laboratoire de l'université de Béchar ont été également soumis au même test:

- ✓ *Fusarium* sp;
- ✓ *Penicillium* sp;
- ✓ *Aspergillus niger* ;
- ✓ *Aspergillus flavus*.

Le choix de ces souches microbiennes a été basé soit sur le pouvoir pathogène, soit leurs capacités à détériorer les produits alimentaires ainsi que leur disponibilité au niveau de laboratoire.

## **II.2. Méthodes**

Tous les tests cités ci- dessous ont été effectués au niveau des laboratoires pédagogiques de la faculté de sciences de la nature et de la vie, université de Jijel, les laboratoires pédagogiques de la faculté de sciences de la nature et de la vie, université Abbes Laghrour, Khenchela, et les laboratoires pédagogiques de l'institut de la nutrition, de l'alimentation et de technologies agroalimentaires (INATAA), université de Constantine 1, Algérie.

### **II.2.1. Détermination des paramètres morphologiques du fruit**

La détermination des caractéristiques morphologiques a été réalisée sur 05 fruits de chaque échantillon de différents stades de maturation. La méthode d'échantillonnage est hasardeuse.

## II. Matériel et Méthodes

---

Pour chaque échantillon les paramètres suivants ont été exprimés comme indiqué par **Tromp (1990)** et **Brewer et al. (2006)**:

- ✓ Les dimensions du fruit entier en « cm », longueur (Lon) et largeur (Lar) au moyen d'un pied à coulisse (STANLEY 1/10, France), ensuite l'index de forme de fruit (IFF) a été déterminé selon la formule suivante:

$$IFF = Lon/Lar$$

- ✓ Le poids de fruit entier ( $P_f$ ) et celui des pépins ( $P_p$ ) au moyen d'une balance de précision (0,01g) (KERN EMB 600-2), puis le rapport Pépins /Fruit (P/F) a été calculé selon la formule suivante:

$$P/F = P_p/P_f$$

### II.2.2. Détermination des caractères physico-chimiques du fruit

#### II.2.2.1. Teneur en eau et en matière sèche

Cinq g (5 g) du fruit de chaque échantillon découpé en petits morceaux ont été chauffés dans une étuve (Memmert, Germany) à  $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  jusqu'à avoir un poids constant (**AOAC, 2000**).

La teneur en eau est déterminée selon la formule suivante :

$$H\% = \frac{(M_1 - M_2)}{P} \times 100$$

Où :

**H%** : Humidité ;

**P** : Poids en grammes de la prise d'essai ;

**M1** : Masse en grammes de la capsule avec la prise d'essai avant dessiccation ;

**M2** : Masse en grammes de la capsule avec la prise d'essai après dessiccation.

A partir de la teneur en eau (H%), nous avons déterminé le taux de matière sèche (MS) qui est donnée par la formule suivante :

$$MS (\%) = 100 - H(\%)$$

#### II.2.2.2. Teneur en cendres et en matière organique

La teneur en cendre des fruits a été déterminée par l'incinération de la matière organique dans un four à moufle (Termolyne/furnace 6000, Pays-Bas) pendant 3-5h à  $550^{\circ}\text{C}$  jusqu'à ce que le poids des creusets devient constant et de couleur blanche ou blanche grisâtre (**AOAC, 2002**).

Le pourcentage de la matière organique (MO) est donné par la formule suivante :

$$MO = \frac{(M_1 - M_2)}{P} \times 100$$

## II. Matériel et Méthodes

---

Où :

**MO** : Matière organique (%) ;

**M1** : Masse en grammes de la capsule avec la prise d'essai ;

**M2** : Masse en gramme de la capsule après incinération ;

**P** : Poids en grammes de la prise d'essai.

La teneur en cendres (Cd) est calculée selon la formule suivante :  $Cd\% = 100 - MO$

### II.2.2.3. pH

100 ml d'eau distillée ont été ajoutés à 10g du fruit coupé en petits morceaux et mélangés pendant 5 minutes jusqu'à l'obtention d'un jus. La mesure a été réalisée en plongeant l'électrode du pH mètre dans la solution. La valeur du pH est enregistrée sur l'écran du pH-mètre (Hanna pH 211, France) (AOAC, 2000).

### II.2.2.4. Acidité titrable

Un poids de 25 g des fruits de chaque échantillon a été coupé en petits morceaux, et placé dans une fiole conique avec 50 ml d'eau distillée récemment bouillie et refroidie, le tout a été mélangé jusqu' à l'obtention d'un liquide homogène. Après avoir adapté un réfrigérant à reflux à la fiole conique, le mélange a été chauffé au bain-Marie (Memmert, Germany) pendant 30min. Après refroidissement, le contenu de la fiole conique a été transvasé dans une fiole jaugée de 250 ml, le volume a été complété jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée récemment bouillie et refroidie. Ensuite une filtration a été appliquée. Enfin, 25 ml du filtrat a été prélevé puis titré par une solution d'hydroxyde de sodium (0, 1 N) en présence de phénolphtaléine jusqu'à l'obtention d'une couleur rose persistante pendant 30 sec (NF V 05-101,01/ 1974).

L'acidité titrable est exprimée en grammes d'acide citrique pour 100 g de fruit frais :

$$A\% = \frac{(250 \times V_1 \times 100)}{V_0 \times M \times 10} \times 0,07$$

Où ;

**M** : Masse, en grammes de la prise d'essai ;

**V0** : Volume en millilitres du filtrat pris pour le titrage ;

**V1** : Volume en millilitres de la solution d'hydroxyde de sodium à 0,1N utilisée ;

**0,07** : Facteur de conversion de l'acidité titrable en équivalent d'acide citrique.

### II.2.2.5. Taux des solides solubles

Le taux des solides solubles (TSS), exprimé en degré Brix, est déterminé à l'aide d'un réfractomètre (ATAGO : HSR-500, France). Une goutte de purée de fruit a été mise sur la

## **II. Matériel et Méthodes**

---

plaque du refractomètre préalablement nettoyée et séchée avec l'eau distillée. Le degré Brix est directement lu sur l'échelle à l'intersection de la limite entre la frange claire et la frange foncée (AOAC, 2002).

### **II.2.2.6. Teneur en vitamine C**

Un poids de 10g de fruit broyé a été mélangé avec 100 ml d'eau distillée. Après homogénéisation et filtration, un volume de 10 ml ( $V_0$ ) de la solution obtenue a été titré par une solution de di-iodé à 0,05mol/l en présence d'une pointe d'empois d'amidon. Le point final de la titration est identifié comme première trace permanente d'une couleur bleu-noire foncée due au complexe amidon-iodé (Ciancaglini et al., 2001). La teneur en vitamine C est exprimée en g/l par la formule suivante puis convertis en mg / 100 g de fruit frais:

$$Vit C = \frac{T \times V \times 176,12}{2E}$$

Où :

**T** : Titre de la solution di-iodé (0,05 mol/l) ;

**V** : Volume d'iodé utilisé (ml) ;

**E** : Prise d'essai (10 ml) ;

**176,12**: Poids moléculaire de l'acide ascorbique (g/mol).

### **II.2.2.7. Teneur en azote total**

Pour faire la minéralisation de la matière organique, 1 g du fruit broyé de chaque stades de maturation, 2 g de catalyseur (sulfate de cuivre et sulfate de potassium), 25 ml d' $H_2SO_4$  concentré à 97 % et 2 ml d'eau oxygénée à 30 % ont été mis dans des matras de l'appareil Kjeldahl (Gerhardt, Allemagne). Ces dernières ont été ensuite chauffées jusqu'à ce que la couleur noire se transforme en une couleur limpide, à ce moment-là l'azote organique est transformé en azote minéral. Après refroidissement, les échantillons minéralisés ont été récupérés dans l'eau distillée tout en ajustant le volume jusqu'à 100 ml.

A 10 ml de chaque échantillon minéralisé, sont additionnés 20 ml d'eau distillée et 30 ml de la soude à 35 %. En parallèle, une solution d'acide borique à 0,1N avec 10 gouttes d'indicateur de Tashiro (de couleur rose-violette dans un milieu acide et verte dans un milieu alcalin) a été préparée. La distillation s'effectue dans un appareil spécifique, elle est arrêtée au bout de 4 minutes à compter du début d'ébullition.

L'excès des anions de borate a été titré par l'acide chlorhydrique (0,1N) jusqu'au virage de la coloration verte au rose-violet. L'azote total (N%) est calculé suivant la formule suivante (Kjeldahl, 1883):

$$(N)\% = \frac{(V_E - V_B) \times 0,014 \times N}{m} \times 100$$

Où :

$V_E$ : Volume de la solution d'acide chlorhydrique utilisée pour la titration de la prise d'essai (ml) ;

$V_B$  : Volume de la solution d'acide chlorhydrique utilisée pour la titration du blanc (ml) ;

$N$  : Normalité de la solution d'acide chlorhydrique utilisée lors du titrage (0,1N) ;

$m$  : Masse de la prise d'essai.

Le taux d'azote total est converti en taux de protéines brutes (PB%) selon la formule suivante :

$$PB\% = N\% \times 6,25$$

D'où 6,25 est le coefficient de conversion générale basé sur le taux moyen d'azote des protéines.

### II.2.2.8. Teneur en lipides

La teneur en lipides contenus dans le fruit a été déterminée selon méthode de référence **NF EN ISO 734-1 (2000)**, en utilisant un appareil de type Soxhlet (Gerhardt, Allemagne). Pour se faire, 20g de broyat de fruits frais de chaque échantillon ont été introduit dans la cartouche du papier filtre qui a été placée par la suite à l'intérieur de l'appareil de Soxhlet, puis, 200ml d'éther de pétrole ont été versés dans le ballon et le tout a été chauffé dans le chauffe ballon pendant 4 heures (20 siphonages par heure) jusqu'à l'extraction de la matière grasse.

Le solvant du ballon a été éliminé par distillation et le résidu a été séché dans une étuve à 70-80°C, puis refroidi dans un dessiccateur pendant 30mn, cette opération de séchage a été répétée jusqu'à l'obtention d'un poids constant. La teneur en matière grasse (MG%) est calculée selon la formule suivant :

$$MG\% = \frac{(P_2 - P_1)}{P_3} \times 100$$

Où :

$P_2$ : Poids du ballon vide en (g) ;

$P_1$ : Poids du ballon avec l'huile extrait en (g) ;

$P_3$ : Poids de la prise d'essai en (g).

### II.2.2.9. Teneur en sucres totaux

La technique utilisée est celle décrite par **Dubois et al. (1956)**. Pour le dosage des sucres de l'arbousier, 10g du fruit broyé de chaque stade de maturation ont été mélangés avec 100ml d'eau distillée, après une agitation adéquate, les solutions obtenues ont été filtrées. Ensuite, dans des tubes à essais, 2ml de chaque filtrat de fruit préparé, 0,05ml d'une solution de phénol

## **II. Matériel et Méthodes**

---

à 80% et 3ml d'acide sulfurique concentré ont été ajoutés, suivis d'une agitation légère et lente.

Le mélange réactionnel est laissé pendant 10 min à une température de 25 à 30 °C (apparition de la couleur jaune-rouge), puis la réaction est stoppée par un courant d'eau froide et la lecture de l'absorbance est faite à 490 nm dans un spectrophotomètre UV-visible (Shimadzu, Japon). En parallèle le blanc et la courbe d'étalonnage du glucose sont préparés dans les mêmes conditions (**Annexe I**).

### **II.2.2.10. Teneur en pectine**

La méthode décrite par **Multon (1991)** a été appliquée pour déterminer l'évolution de la concentration en pectines de fruit pendant la maturation. 2,5 g de fruit ont été introduit dans une fiole conique à col rodé de 100 ml, puis 500ml d'acide chlorhydrique à 1/30N ont été ajoutés, la fiole a été bouchée par un tube réfrigérant et portée au bain Marie (Memmert, Germany) pendant 30min.

Après filtration, le précipité a été lavé à l'eau chaude (1<sup>er</sup> filtrat) et le contenu du papier filtre a été passé par la suite dans une fiole conique puis 50ml de l'acide oxalique à 0,5% a été ajouté et la fiole a été adaptée à un tube réfrigérant. La préparation est portée au bain Marie à 100°C pendant 20 min puis filtrée et le précipité a été lavé à l'eau chaude (2<sup>eme</sup> filtrat).

Les deux filtrats ont été introduit dans une fiole jaugée de 200ml et neutralisés avec la soude caustique à 15% en présence de phénolphthaléine, le volume a été complété avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge. 50ml du filtrat obtenu a été versé dans une fiole de 200ml, puis 50ml de la soude caustique à 0,4% a été ajouté. La préparation est laissée reposer pour faire passer la saponification des liaisons complexes.

Après saponification, 50ml de l'acide acétique (1N) et 50ml de la solution de chlorure de calcium à 11,1% ont été ajoutés et laisser réagir 30 min, le précipité a été porté sur un papier filtre préalablement séché et taré puis lavé par la solution de chlorure de calcium à 0,5%, ensuite à l'eau distillée froide. Enfin, il a été lavé à l'eau chaude jusqu'à élimination complète des ions de chlore, puis séché (avec le précipité) jusqu'à l'obtention d'un poids constant dans une étuve (Memmert) réglée à 100-105°C.

La teneur en pectine (P) est exprimée en pourcentage de matière sèche par la formule suivante :

$$P\% = \frac{A \times V_F \times 0,9235}{V_P \times a}$$



## II. Matériel et Méthodes

---

Où:

**A** : Poids de précipité (g) ;

**V<sub>F</sub>** : Volume du filtrat (ml) ;

**0,9235** : Coefficient de transformation du pectate de calcium en pectine ;

**V<sub>P</sub>** : Volume du filtrat pris pour la précipitation (ml) ;

**a** : Poids de filtrat (g).

### II.2.2.11. Teneur en fibres brutes

Dans un Erlenmeyer, 0,5 g de poudre de fruit de chaque stade de maturation a été mélangé avec 50 ml d'acide formique à 80%. Le mélange a été porté à ébullition pendant 75 minutes. Après filtration, le résidu a été séché à l'étuve à 103±2 °C jusqu'à l'obtention d'un poids constant (Multon, 1991). Le pourcentage en fibres (F%) est calculé selon la formule :

$$F\% = \frac{(P_1 - P_2)}{P_0} \times 100$$

Où:

**P<sub>1</sub>** : poids de la capsule avant séchage (g);

**P<sub>2</sub>** : poids de la capsule après séchage (g);

**P<sub>0</sub>** : poids de la poudre de fruit (g).

### II.2.3. Etude phyto-chimique du fruit d'*A. unedo* pendant la maturation

#### II.2.3.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux

##### II.2.3.1.1. Préparation des extraits bruts secs

Les extraits de fruit d'*A. unedo* (EFA) ont été préparés selon la méthode décrite par **Isbilir et al. (2012)** : Une prise d'essai de 10g de poudre de chaque échantillon a été mise à macérer dans 50ml de méthanol absolu (99,8%) (Le choix du méthanol a été basé sur des essais préliminaire en utilisant d'autres solvants à savoir l'éthanol et l'acétone, le méthanol a donné le meilleur rendement d'extraction) sous agitation à température ambiante pendant une nuit. L'EFA a ensuite été filtré (filtre N°4) et le résidu a été ré-extrait deux fois puis évaporé à sec sous pression réduite à 40°C au Rota-vapeur (Buchi, Switzerland). Le résidu sec a été pesé et conservé à 4°C. Les trois EFA obtenus sont nommés, extrait de fruit vert (EFV), extrait de fruit jaune (EFJ) et extrait de fruit rouge (EFR).

##### II.2.3.1.2. Calcul du rendement

Le pourcentage en EFA bruts sec est calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = \frac{M}{M_0} \times 100$$

Où:

**R** : Rendement (%) ;

**M**: Masse de l'EFA sec résultant (g) ;

**M<sub>0</sub>** : Masse de la poudre de fruit utilisée (g).

### **II.2.3.1.3. Dosage des phénols totaux**

La teneur en phénols totaux des EFA a été déterminée par la méthode de **Singleton et Ross (1965)**, en utilisant le réactif de Folin–Ciocalteu. Un volume de 200 µl de chaque EFA à concentration de 2mg/ml a été introduit dans des tubes à essais puis le mélange (1 ml de Folin- Ciocalteu dilué 10 fois et 0,8 ml de carbonate de sodium à 7,5 %) a été additionné dans chaque tube. Le mélange réactionnel a été agité et laissé à l'obscurité à température ambiante pendant 30 min. Un témoin a été aussi préparé dans les mêmes conditions. L'absorbance a été mesurée à 765 nm. Une courbe d'étalonnage aux différentes concentrations d'acide gallique est préparée (**Annexe I**). La teneur en phénols totaux dans l'EFA sont exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) d'extrait (mg EAG/ g E).

### **II.2.3.1.4. Dosage des flavonoïdes**

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode colorimétrique adaptée par **Zhishen et al. (1999)**. Une quantité de 500 µl de l'EFA (2mg/ml) a été ajoutée à 1500 µl de l'eau distillée. A temps zéro, 150 µl de nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>) à 5% a été additionné au mélange. Après 5 min, 150 µl de trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) à 10% (m/v) ont été rajouté. Après une incubation de 6 min à température ambiante, 500 µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) (1 M) ont été additionné. Immédiatement, le mélange a été complètement agité.

L'absorbance de la solution de couleur rosâtre est mesurée à 510 nm contre le blanc. La teneur en flavonoïdes totaux de l'EFA est exprimée en milligramme (mg) équivalent de la quercétine par gramme (g) d'extrait (EQ)/g E). Elle est calculée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine comme standard (**Annexe I**).

### **II.2.3.1.5. Dosage des tannins condensés**

La concentration des tannins condensés a été estimée en utilisant la méthode à vanilline en milieu acide (**Julkunen-Titto, 1985**). Un volume de 50 µl de chaque EFA (2mg/ml) a été ajouté à 1500 µl de la solution vanilline/méthanol (4 %, m/v), puis mélangé à l'aide d'un vortex. Ensuite, 750 µl de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) ont été additionné et laissé réagir à température ambiante pendant 20 min. L'absorbance est mesurée à 550 nm contre un blanc.

La concentration des tannins est estimée en milligramme (mg) équivalent de la catéchine par gramme (g) d'extrait (EC)/g E) à partir de la courbe d'étalonnage (**Annexe I**).

### **II.2.3.2. Evaluation du pouvoir antioxydant des EFA**

#### **II.2.3.2.1. Capacité antioxydante totale (CAT)**

Un volume de 0,3 ml de chaque EFA de différentes concentrations (0,1 ; 0,2 ; 0,4 et 0,8 mg/ml) a été mélangé avec 3 ml de la solution du réactif (1ml d'acide sulfurique (0,6 M), 1ml de la solution de phosphate de sodium (28 mM) et 1ml de la solution de molybdate d'ammonium (4 mM)). Les tubes ont été vissés et incubés à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement, l'absorbance des solutions a été mesurée à 695 nm contre le blanc préparé dans les mêmes conditions (3 ml de la solution du réactif et 0,3 ml du méthanol) (**Prieto et al., 1999**).

La capacité antioxydante totale est exprimée en milligramme équivalent d'acide ascorbique par gramme d'extrait (mg EAA/ g E) à partir de la courbe d'étalonnage (**Annexe I**).

Les concentrations effectrices 50 (EC50) sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés (**Annexe II**).

#### **II.2.3.2.2. Réduction de fer : FRAP**

Le pouvoir réducteur a été déterminé suivant la méthode décrite par **Oyaizu (1986)**. 1 ml de de chaque EFA à différentes concentrations (0,1 ; 0,2 ; 0,4 et 0,8 mg/ml) a été mélangé avec 2,5 ml de la solution tampon phosphate (0,2 M ; pH 6,6) et 2,5 ml de la solution de ferricyanure de potassium ( $K_3Fe(CN)_6$ ) à 1%. Les mélanges ont été incubés à 50°C pendant 30 min. Ensuite, 2,5 ml de l'acide trichloracétique (10%) a été additionné. Le tout a été centrifugé à 3000 tours pendant 10 min.

2,5 ml du surnageant de ont été mélangé avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5ml de  $FeCl_3$  (0,1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif dans les mêmes conditions opératoires.

Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances obtenues en fonctions des différentes concentrations utilisées pour chaque fruit. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées. Les **EC50** ont été déterminés directement à partir de ces graphes (**Annexe II**).

#### **II.2.3.2.3. Piégeage du radical libre DPPH<sup>•</sup>**

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la technique décrite par

**Sanchez-Moreno et al. (1998).** La solution de DPPH a été préparée par solubilisation de 2,5 mg de DPPH dans 100ml du méthanol.

Un volume de 50 µl de chaque EFA à concentrations de 0,1 ; 0,2 ; 0,4 et 0,8 mg/ml, a été ajouté à 1,950 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025 g/l) fraîchement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier a été préparé en parallèle en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1,950 ml d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée.

Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à température ambiante, la lecture des absorbances a été effectuée à 517 nm. Le contrôle positif est représenté par une solution d'acide ascorbique dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration.

Pour le calcul des pourcentages d'inhibitions, la formule suivante est utilisée:

$$I\% = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

Où:

**I %:** Pourcentage de l'inhibition du radical DPPH ;

**A<sub>c</sub> :** absorbance du contrôle ;

**A<sub>t</sub> :** absorbance du test effectué.

Les concentrations effectrices **EC50** ont été déterminées à partir des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des EFA (**Annexe II**).

### II.2.3.2.4. Activité antioxydant mesurée par le radical cation ABTS

Le radical cation ABTS a été généré en mélangeant un volume égal d'une solution de 2,45 mM de persulfate de potassium (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) et une solution stock d'ABTS à 7 mM, le tout a été conservé à l'abri de la lumière et à température ambiante durant 16 h avant utilisation (**Re et al., 1999**).

La solution obtenue a été diluée avec de l'éthanol pour obtenir une absorbance comprise entre 0,7 et 0,8 à 734 nm. 3ml de cette solution fraîchement préparée a été ajoutée à 30 µl de chaque EFA aux différentes concentrations (0,1 ; 0,2 ; 0,4 et 0,8 mg/ml). La lecture a été faite à 734 nm après 6 min pour chaque série d'analyses. Le Trolox a été utilisé comme contrôle positif. Les **EC50** ont été déterminées pour chaque EFA (**Annexe II**).

### II.2.3.2.5. Piégeage du peroxyde d'hydrogène

Le piégeage du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a été déterminé par la méthode décrite par **Ruch et al. (1989)** : Une solution d' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM) a été préparée dans un tampon phosphate (pH 7.4). Le mélange réactionnel est composé de 0,6ml de cette solution et de 1ml de chaque EFA aux différentes concentrations (0,1 ; 0,2 ; 0,4 et 0,8mg/ml).

Les valeurs d'absorbance ont été mesurées après 60 min à 240nm. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard. Les **EC50** ont été aussi déterminées (**Annexe II**).

Le pourcentage de piégeage du peroxyde d'hydrogène est calculé par la formule suivante :

$$\text{Piégeage H}_2\text{O}_2\% = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100$$

Où:

A<sub>0</sub>: absorbance d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ;

A<sub>1</sub>: absorbance de mélange réactionnel.

### II.2.4. Analyse de l'EFR par HPLC-DAD

Les principaux polyphénols ont été évalués par analyse HPLC / détecteur à barrette de diodes (DAD), réalisée à l'aide d'un système HPLC Jasco Extrema LC-4000 (Jasco Inc., Easton, MD, USA) équipé d'un échantillonneur automatique, d'une pompe à solvant binaire, et un détecteur à barrette de diodes (DAD). L'analyse a été réalisée au niveau de laboratoire de recherche de département de pharmacie, école de médecine et chirurgie, université de Naples, Federico II, Naples, Italie

La séparation et la quantification ont été réalisées en utilisant une colonne Synergy Polar-RP C18 (250 × 4,6 mm de diamètre intérieur, taille de particule de 5 µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) précédée d'une cartouche de garde de sécurité Polar RP. La température de la colonne a été réglée à 35 °C. La phase mobile était constituée d'acide formique à 0,1% dans l'eau (v / v) (A) et l'acétonitrile (B). Le volume d'injection était de 20 µL et le débit était maintenu à 1 ml / min. L'élution a été réalisée selon les conditions suivantes: 0–2 min 90% (A), 2-17 min de 90% à 40% (A), 17-22 min 40% (A), 22-28 min de 90% à 40% (A), 28 -33 min 90% (A) (**Annunziata et al., 2019**).

Des analyses HPLC- DAD ont été effectuées en surveillant trois longueurs d'onde différentes: 280 nm pour la procyanidine et les flavanols, 315 nm pour les acides hydroxycinnamiques et 360 nm pour les flavonols. Les composés phénoliques de l'EFR ont été identifiés en comparant le temps de rétention et les spectres d'absorption UV aux standards disponibles. La quantification a été effectuée avec des courbes standard d'étalons externes générées en traçant les zones de pic HPLC en fonction des concentrations (mg/l) (r<sup>2</sup>> 0,99).

### **II.2.5. Evaluation de l'activité antimicrobienne des EFA**

#### **II.2.5.1. Préparation des inoculums et des extraits**

Les souches bactériennes ont été revivifiées par ensemencement du bouillon nutritif suivi d'une incubation à 37°C pendant 24 heures. Chaque culture a été repiquée par ensemencement en strie sur la gélose nutritive. Après incubation, les colonies bien isolées ont été collectées pour préparer des suspensions bactériennes dont la densité a été standardisée à 0,5 McFarland, ce qui équivaut à  $1,5 \times 10^8$  UFC / ml (CLSI, 2013).

Concernant les souches fongiques, elles ont été repiquées sur gélose Sabouraud et incubées à 25°C pendant 5 jours. Chaque culture a été ensuite lavée par 10ml de la solution de Tween20 à 1% afin de récupérer les spores fongiques. Une fois les suspensions fongiques récupérées, nous avons préparé des standards (méthode de suspension-dilutions) de  $10^5$  spores/ml en utilisant la cellule de Malassez (Guarro *et al.*, 1998).

Les EFA bruts de chaque stade de maturation ont été solubilisés dans du diméthylsulfoxyde DMSO (1%) pour obtenir des concentrations de 200 mg/ml, cette dernière a été fixée sur la base des essais préliminaires en utilisant différentes concentrations.

#### **II.2.5.2. Test de l'activité antimicrobienne**

##### **II.2.5.2.1. Méthode de diffusion sur gélose**

La méthode de diffusion sur gélose (méthode des disques) a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne des EFA vis-à-vis des microorganismes cibles (CLSI, 2013).

Des boîtes de la gélose Mueller-Hinton (M-H) ont été inoculées par écouvillonnage, puis des disques de papier Wattman N°1 stériles (6mm de diamètre) imbibés par 20 µl de différents EFA, ont été placés à la surface des géloses.

Les témoins négatifs ont été préparés en remplaçant les EFA par le DMSO. La lecture des résultats est réalisée après une incubation de 24h à 37 °C pour les souches bactériennes et 5 jours à 25°C pour les souches fongiques. L'activité antimicrobienne a été détectée par la présence d'une zone d'inhibition autour des disques.

##### **II.2.5.2.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI), bactéricides (CMB) et fongicides (CMF)**

**Pour la détermination des CMI**, des plaques de micro-dilution (96 puits) ont été utilisées selon la méthode de référence du (NCCLS) (CLSI, 2013).

## **II. Matériel et Méthodes**

---

A partir de chaque EFA (0,2 g/ml), une série de dilutions a été effectuée dans le DMSO; la gamme des concentrations finales obtenues correspondait à 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/132 et 1/246. 100 µl de chaque dilution ont été ajoutés à 95 µl de bouillon M-H et puis ensemencés avec 5 µl de suspensions d'inoculum de la souche testée. Les microplaques ont été ensuite incubées à 37 ° C pendant 24 h.

Les CMI ont été déterminées par la méthode classique. La CMI a été défini comme la plus faible concentration d'extrait pour laquelle aucune croissance n'était visible.

**Pour la détermination des CMB et CMF :** des tubes contenant le bouillon M-H ont été ensemencés par chaque puits qui ne présentait aucune croissance lors de la détermination des CMI puis incubé à 37 ° C pendant 24 h (CLSI, 2013). La concentration d'EFA la plus basse qui n'a révélé aucune croissance bactérienne ou fongique visible après incubation a été considérée comme CMB ou CMF respectivement.

En outre, les rapports (CMB/CMI) et (CMF/CMI) ont été également calculés pour déterminer l'effet bactéricide/bactériostatique et fongicide/fongistatique des EFA.

### **II.2.6. Application de l'EFR dans la conservation des aliments**

#### **II.2.6.1. Préparation des films d'emballage à base de gélatine**

Les solutions filmogènes (SFF) (concentration finale de gélatine 4%) ont été préparées comme décrit par **Gómez Estaca et al. (2009)**. La poudre de la gélatine commerciale d'origine porcine de type A (300 g de Bloom, point isoélectrique 7) a été initialement dissoute dans de l'eau distillée à un rapport de 4g/50 ml. Sur la base de l'étude rapportée par **Thomazine et al. (2005)**, le glycérol (0,3 g/g de la gélatine) a été ajouté comme plastifiant.

Après un mélange approprié, l'EFR a été incorporé à un rapport de 1:1 (gélatine dissoute: EFR). La concentration finale de l'EFR dans les SFF pour les films testés (FA) était de 1 mg/ml. Les SFF pour les films témoins (FT) ont été préparés comme décrit ci-dessus en remplaçant l'EFR par de l'eau distillée stérile.

Chaque SFF a été chauffée à 40°C et agité pendant 15 min pour obtenir des solutions homogènes, puis versée doucement et équitablement dans des plateaux pour obtenir une épaisseur uniforme (0,1mm). Les SFF ont été ensuite séchées dans une étuve ventilée (Mettler, Germany) à 45 ° C pendant 15 heures. Les films obtenus ont été conditionnés dans un dessiccateur en présence d'une solution saturée de bromure de sodium (BrNa) (HR 58%) à 22 °C pendant 2 jours avant l'utilisation.

### II.2.6.2. Propriétés physico-chimiques du film

#### II.2.6.2.1. Perméabilité à la vapeur d'eau

La perméabilité à la vapeur d'eau (PVE) des films a été mesurée en utilisant la méthode **ASTM (1989)** modifiée décrite par **Shiku (2004)**. Des films ont été scellés sur les ouvertures d'une coupelle en verre contenant du gel de silice (0% HR) en utilisant la graisse et un joint torique pour maintenir le film en place. Les tasses ont été ensuite placées dans un dessiccateur avec de l'eau distillée à 30 °C. Les coupelles ont été pesées à des intervalles de 1 h sur une période de 7 h, et la perméabilité à la vapeur d'eau a été calculée en utilisant l'équation suivante:

$$PVE = \frac{w \times x}{A \times t \times (P_2 - P_1)}$$

Où :

**W** : Poids de tasse (g) ;

**X** : Epaisseur du film (mm) ;

**A** : Zone du film exposé (cm<sup>2</sup>) ;

**t** : Temps écoulé pour le gain de poids (h) ;

**(P<sub>2</sub>-P<sub>1</sub>)** : Différence de pression de vapeur partielle entre l'atmosphère sèche et l'eau pure.

La PVE est exprimé en (g.mm/h.cm<sup>2</sup>.Pa).

#### II.2.6.2.2. Opacité du film

Les propriétés de barrière des films contre les ultraviolets (UV) et la lumière visible ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre d'UV-Visible (modèle UV-1800, Shimadzu Co., Kyoto, Japon). Les films ont été coupés en morceau de rectangle et directement placés dans une cuve de spectrophotomètre, en utilisant une autre cuve vide comme référence. L'index d'opacité des films a été calculé en appliquant l'équation suivante (**Han et Floros, 1997**) :

$$O = (Abs_{600})/x$$

Où :

**Abs<sub>600</sub>** : Valeur de l'absorbance à 600 nm ;

**X** : Epaisseur du film (mm).

#### II.2.6.2.3. Solubilité dans l'eau

Des morceaux de film de 4 cm<sup>2</sup> ont été pesés et placés dans des béchers avec 15 ml d'eau distillée, puis scellés et agités doucement à 22° pendant 15 h. La solution a été alors filtrée à l'aide du papier Whatman N° 1 pour récupérer le film non dissous restant, qui était desséché à 105°C/24 h. La solubilité de films (SF) a été calculée selon l'équation suivante (**Gómez-Estaca et al., 2009**) :



$$SF(\%) = \frac{(W_0 - W_f)}{W_0} \times 100$$

Où :

$W_0$  : Poids initial du film exprimé comme la matière sèche ;

$W_f$  : Poids du résidu desséché non dissous de film.

### II.2.6.2.4. Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

L'analyse a été réalisée au niveau de laboratoire des structures, propriétés et interactions interatomiques (LASPI2A), faculté des sciences et technologies, université Abbes Laghrour, Khenchela, Algérie, elle a été faite selon les instructions du fabricant comme suit :

30 mg du film ont été prélevés et mise dans un mortier en agate, ils ont été mélangés par la suite avec 100 mg de la poudre de bromure de potassium (KBr). Un broyage pendant au moins 3 min a été nécessaire afin d'avoir un ensemble finement broyé et bon pour le pastillage.

Le mélange a été introduit dans le moule pour pastille et comprimée dans une presse isostatique à froid (CIP) à une pression de 150 MPa afin d'obtenir une pastille de 200 à 300  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Elle a été ensuite extraite du moule avec précaution pour être placée dans un porte échantillon. L'appareillage analyse préalablement un spectre de l'air ambiant relatif à l'atmosphère qui règne dans la salle d'analyse.

Les spectres infrarouges ont été enregistrés entre 4000 et 500  $\text{cm}^{-1}$  avec une résolution de 8  $\text{cm}^{-1}$  à température ambiante en utilisant un spectromètre (Perkin Elmer, USA) (120 scans pour chaque échantillon). Tous les spectres infrarouges rapportent l'absorbance ( $A = -\log(I/I_0)$ ) comme une fonction des nombres d'ondes incidents.

### II.2.6.2.5. Activité antioxydante des films obtenus

Afin de déterminer l'activité antioxydante des films préparés (FT et FA), les échantillons ont été préparés selon la méthode de **Jongjareonrak et al. (2006)** avec quelques modifications: Les films ont été solidifiés par congélation et broyés. 0,1 g de leurs poudres ont été mélangés avec 2ml de méthanol puis agité vigoureusement pendant 3 h et centrifugé à 5500 rpm/10min. Le surnageant obtenu a été utilisé pour le test de DPPH.

La réduction de radical DPPH a été déterminée selon la méthode décrite par **Yen et Hsieh (1995)** avec quelques modifications. 500 $\mu\text{l}$  d'extrait méthanolique a été mélangé avec 2ml de solution méthanolique de DPPH à 0,06mM. Le mélange a été agité puis conservé à l'abri de la lumière à température ambiante pendant 30 min. L'absorbance a été mesurée à 517 nm. Le

## **II. Matériel et Méthodes**

---

contrôle a été préparé de la même manière sauf que le méthanol doit être utilisé au lieu de l'extrait du film étudié.

La réduction du radical DPPH (R%) a été calculée selon l'équation suivante (**Singh et Ragini, 2004**) :

$$R(\%) = [1 - (A_e/A_c)] \times 100$$

Où :

$A_e$  : Absorbance de l'extrait du film ;

$A_c$  : Absorbance du contrôle.

### **II.2.6.3. Etude de l'effet du film sur l'oxydation du beurre**

#### **II.2.6.3.1. Préparation des échantillons**

Le beurre a été coupé en morceaux homogène de poids de  $25 \pm 0,5g$ . Trois groupes d'expériences ont été réalisés: dans le premier groupe, les morceaux de beurre ont été recouvertes par l'EFR seul à une concentration de 2 mg / ml dans l'eau distillée stérile, pour le deuxième et le troisième groupes, les échantillons ont été enveloppés par les films témoin (FT) et testé (FA) respectivement; en outre, certains échantillons ont été conservés sans aucun traitement et considérés comme des témoins négative (TN). Tous les échantillons ont été conservés à 4 °C pendant 21 jours.

#### **II.2.6.3.2. Analyses physicochimiques du beurre pendant la conservation**

Les analyses ont été réalisées en répétitions chaque trois jours.

**Pour la détermination de l'acidité :** Elle a été mesurée selon la norme **AFNOR (1984)**. 6g de la matière grasse a été dissous dans 100ml de mélange éthanol/toluène (V/V), puis titré sous agitation avec la solution d'hydroxyde de potassium (KOH) à 0,5N en présence de 0,3ml de la solution de phénolphthaléine à 1% dans l'éthanol, jusqu'au virage de l'indicateur (coloration rose).

L'acidité, est exprimée en pourcentage d'acide oléique et calculée selon l'équation:

$$\text{Acidité}(\%) = (V \times C \times M / 10 \times m)$$

Où :

$V$  : Volume (ml) de la solution titrée de KOH utilisée ;

$C$  : Concentration (mol / l), de la solution titrée de KOH utilisée ;

$M$  : Poids molaire de l'acide oléique adopté pour l'expression de résultat (282g / mol) ;

$m$  : Prise d'essai (g).

## **II. Matériel et Méthodes**

---

**Pour la détermination de la teneur en peroxyde :** La teneur en peroxyde (PV) a été mesurée selon la norme **AFNOR (1984)**. L'échantillon de beurre (4 g) a été mélangé avec 25 ml de mélange d'acide acétique : chloroforme (3:2, v/ v), suivi par l'addition d'une solution saturée de l'iodure de potassium (1 ml). Le mélange réactionnel a été conservé pendant 5 min à l'obscurité. 75 ml d'eau distillée ont été ajoutés au mélange puis titré avec une solution de thiosulfate de sodium à 0,01M et 1ml d'amidon à 1% comme indicateur.

La PV est exprimé en milliéquivalent de l'oxygène actif par Kilogramme du beurre (meq O<sub>2</sub>/kg) en utilisant l'équation suivante :

$$PV = (a - b) \times N \times 1000/W$$

Où :

**A et b :** Volume (ml) de thiosulfate de sodium utilisé pour la titration de blanc et de l'échantillon respectivement ;

**N :** Molarité exacte de thiosulfate de sodium ;

**W :** Poids de l'échantillon (g).

**Pour la détermination de l'indice TBARS :** L'évolution de valeur de TBARS (Les substances réactives à l'acide thiobarbiturique) des échantillons de beurre pendant la conservation au froid a été déterminée selon la méthode de **Buege et Aust (1978)**. 0,1 g de l'échantillon ont été mélangés avec 5 ml de solution TBA (0,375 g d'acide thiobarbiturique, 15 g de l'acide trichloroacétique, et 0,875 ml de l'acide hydrochlorique mélangé en 100 ml d'eau distillée).

Le mélange a été chauffé pendant 10 min dans un bain d'eau bouilli (95-100°C) jusqu'au développement d'une couleur rose, refroidi sous l'eau du robinet puis centrifugé à 7500 t/min pendant 10 min. L'absorbance a été mesurée à 532 nm. Une courbe d'étalonnage a été préparée en utilisant le bis-malonaldehyde (diméthyleacétale) (MDA) à concentration variée de 0 à 1000 µM. La valeur de TBARS dans chaque échantillon a été exprimée en MDA/ Kg d'échantillon en utilisant la courbe d'étalonnage correspondante (**Annexe I**).

### **II.2.6.4. Etude de l'effet antibactérien du film sur la sardine**

#### **II.2.6.4.1. Analyse de la matière première**

**Pour la mesure du pH :** 2 g de la sardine a été broyé dans un mortier, 20 ml d'eau distillée ont été rajouté et le mélange a été agité pendant 5 min afin d'obtenir une solution homogène. La mesure du pH a été réalisée en plongeant l'électrode du pH-mètre dans la solution. La valeur du pH est enregistrée sur l'écran de l'appareil (**AOAC, 2000**).

## II. Matériel et Méthodes

---

**Pour l'analyse microbiologique :** La charge microbienne initiale de la sardine a été évaluée selon les techniques décrites par **Guiraud (2003)**, les flores recherchées et dénombrées sont la flore totale aérobie mésophile (FTAM), les coliformes totaux (CT) et thermotolérants (CTT), *Salmonella*, *S. aureus*, *L.monocytogenes*, *P. aeruginosa*, les levures et moisissures. Pour cela, une solution mère a été préparée en mélangeant 1g de la chair de sardine broyée avec 9 ml d'eau physiologique stérile. Des dilutions décimales ont été préparées à partir de cette solution. Tous les ensemencements ont été réalisés en double:

**-Dénombrement de la FTAM:** le dénombrement a été effectué par l'ensemencement de 1 ml des dilutions décimales en surface de la gélose PCA. L'incubation s'est effectuée à 30°C pendant 24h. Après cette durée, toutes colonies ont été dénombrées.

**-Dénombrement des CT et CTT:** Le dénombrement est réalisé sur gélose VRBL, par ensemencement en masse de 1ml des dilutions décimales suivi d'une incubation à 37°C pendant 24h pour les CT et à 44°C pendant 24h pour les CTT. Toutes les colonies roses – rouges qui apparaissent après ce temps d'incubation ont été comptées.

**-Recherche et dénombrement de *Salmonella*:** La recherche de *Salmonella* a été effectuée en homogénéisant 25 g de la chair de la sardine dans 225 ml de l'eau peptonée tamponnée pendant 2 min. Après une incubation de 24 h à 37°C, 1 ml de la culture obtenu a été ensemencé dans des tubes à essai stériles contenant chacun 9 ml de bouillon d'enrichissement sélectif Sélénite-cystine, puis incubé pendant 24 h à 37°C. Le changement de couleur initiale de bouillon fraîchement préparé indique une croissance bactérienne.

L'isolement se fait sur la gélose Héктоen par ensemencement en stries à partir des tubes de bouillon Sélénite-cystine, les boîtes sont incubées pendant 24 h à 37°C. Après incubations, les colonies caractéristiques de *Salmonella* sont lisse et de couleurs verte à centre noir.

**-Dénombrement de *S. aureus* :** Le dénombrement est réalisé sur gélose Baird Parker, par ensemencement en surface de 0,1ml des dilutions décimales suivi d'une incubation à 37°C pendant 24h. Les colonies suspectes sont des colonies noires, convexes, brillantes de diamètre compris entre 0,5 et 2 mm, avec un liseré blanc opaque entouré d'une auréole claire.

**- Recherche et dénombrement de *L. monocytogenes* :** La recherche de *Listeria* a été effectuée en homogénéisant 25 g de la chair de la sardine dans 225 ml de bouillon de pré-enrichissement Fraser demi. Après incubation de 24 h à 30°C, des volumes de 10ml de bouillon sélectif de Fraser ont été ensemencés avec 0,1 ml de la culture de pré-enrichissement.

## **II. Matériel et Méthodes**

---

Le bouillon sélectif a été incubé à 37°C durant 48 h. Un aliquote de ce bouillon a été, par la suite,ensemencé sur une gélose Oxford et incubés à 37°C pendant 48 h. Après le temps d'incubations, *L.monocytogenes* forme des colonies noires de 2 à 3 mm de diamètres entourés d'un halo noir et dont le centre est affaissé.

**-Recherche et dénombrement de *P. aeruginosa* :** La recherche de *P. aeruginosa* a été effectuée par l'étalement de 0,1 ml des dilutions décimales à la surface de la gélose au cétrimide. Après l'incubation à 37°C pendant 24 h, les colonies de *P. aeruginosa* ont un diamètre de 1,5 à 2 mm, un contour circulaire, une surface lisse et brillante, une couleur blanche crème, un aspect muqueux et sont parfois accompagnées d'une production de pigment bleu-vert qui commence à diffuser avec émission de fluorescence sous U.V.

**-Dénombrement des levures et moisissures :** Le dénombrement est effectué sur la gélose PDA. 0,1ml des dilutions décimales a été étalé en surface du milieu et les boites sont incubées pendant 3 à 5 jours à une température de 25°C. Après incubation, les colonies de différentes couleurs sphériques et/ou filamenteuses ont été dénombrées.

### **II.2.6.4.2. Essai de bioconservation de la sardine**

Pour tester l'effet antibactérien du film préparé contre les bactéries pathogènes, (*S. aureus*, *L. monocytogenes*) et d'altération (*P. aeruginosa*), des filets de Sardine fraiche ont été inoculés séparément par chaque suspension bactérienne contenant environ 10<sup>5</sup> UFC/ml.

Pour chaque essai, nous avons préparé les échantillons comme suit:

- ✓ Echantillon 1 : les sardines ont été recouvertes avec l'EFR seul à une concentration de 2 mg / ml ;
- ✓ Echantillon 2 : les sardines ont été enveloppées dans du FT;
- ✓ Echantillon 3 : les sardines ont été enveloppées dans du FA ;
- ✓ Echantillon 4 : les sardines ont été conservées sans aucun traitement (TN).

Tous les échantillons ont été conservés à 4 °C pendant 12 jours.

### **II.2.6.4.3. Contrôle de la sardine pendant la conservation**

**Pour l'évolution du pH :** La variation du pH de la chair du poisson pendant la conservation a été évaluée comme décrit précédemment (section **II.2.6.4.1**)

**Pour l'évolution de la charge bactérienne :** Afin de déterminer l'effet antibactérien du film incorporé d'EFR vis-à-vis des souches bactériennes mis au test (*S. aureus*, *L. monocytogenes*

## ***II. Matériel et Méthodes***

---

et *P. aeruginosa*), le dénombrement des bactéries a été réalisé à partir des prélèvements de quatre jours selon les méthodes décrites précédemment (**Section II.2.6.4.1.**).

### **II.2.7. Analyse statistique des résultats**

Toutes les expériences ont été réalisées en triple. Les données ont été soumises à une analyse de variance et les moyennes ont été comparées par le test de Tukey à un niveau de signification de  $p < 0,05, 0,01, 0,001$ . Le test de Dunnett a été utilisé pour comparer chaque groupe expérimental avec le témoin négatif. Toutes les statistiques ont été réalisées en utilisant la version du logiciel STATISTICA 11,0 (Copyright Stat Soft, Inc. 1984-2012).

## **III. Résultats et Discussion**

#### **III.1. Morphologie et physico-chimie du fruit d'*A.unedo***

##### **III.1.1. Caractéristiques morphologiques du fruit**

La description des fruits est souvent nécessaire dans la recherche horticole pour différentes fins, comme la description et la sélection des cultivars. La taille et la forme des fruits sont un trait de qualité important des fruits dans un but commercial et en particulier l'acceptation par le consommateur. De plus, la taille peut affecter la composition chimique et la caractéristique sensorielle du fruit (**Chang et al., 2014 ; Prudent et al., 2014**).

Les résultats des caractéristiques morphologiques du fruit en trois stades de maturation (FV, FJ et FR) sont présentés dans le tableau 3 ( $p > 0,05$ ). D'après les résultats obtenus, il ressort que le poids moyen du fruit entier est de  $4,194 \pm 2,31g$ ,  $5,102 \pm 2,57g$  et  $5,33 \pm 2,61g$  pour FV, FR et FJ respectivement ( $p > 0,05$ ).

Les résultats d'une étude menée par **Boussalah et al.(2018)** ont montré que le poids des baies d'*A. unedo* récoltées en pleine maturation de différentes régions du Nord Algérien (Skikda, Bordj-Mira, Adekar et Medea) était compris entre 1,66 et 12,46 g avec un poids moyen de 5,87 g. Par ailleurs, **Celikel et al. (2008)** et **Sulusoglu et al. (2011)** ont rapporté que le poids des fruits mûrs d'*A.unedo* d'origine Turque se situait entre 3,09g à 11,08 g et 1,13g à 6,46 g respectivement.

La valeur de l'indice de forme des fruits (IFF) est de l'ordre de 1,1, 1,06 et 1,09 pour FV, FJ et FR respectivement. D'après **Boussalah et al.(2018)**, l'étude de la caractéristique géométrique a révélé trois formes de fruits: forme ronde ( $0,9 < IFF < 1,1$ ), forme allongée ( $IFF > 1,1$ ) et forme plate ( $IFF < 0,9$ ). Cette distribution de la fréquence de l'IFF, nous laisse classer nos fruits de différents stades de maturation dans la forme ronde.

Selon l'étude morphologique réalisée sur le même fruit au stade rouge par **Celikel et al.(2008)**, la largeur et la longueur de ce dernier sont respectivement  $2,11 \text{ cm} \pm 0,7$  et  $2,30 \text{ cm} \pm 0,66$  ce qui a donné un IFF de l'ordre de 1,09 semblable à nos résultats, d'autre part, **Vitale (2012)** a trouvé des dimensions inférieure pour un fruit de poids moyen de  $5,26 \pm 1,77 \text{ g}$ . De même, **Boussalah et al. (2018)** ont obtenu des valeurs d'IFF allant de 0,68 et 1,28 selon la région de la récolte du fruit mature.



**Tableau 3.** Paramètres morphologiques des fruits d'*A.unedo* aux trois stades de maturation.

Paramètres	Stades de maturation		
	FV	FJ	FR
Poids de fruit entier (g)	4,19 ± 2,31 <sup>(a)</sup>	5,33 ± 2,61 <sup>(a)</sup>	5,10 ± 2,57 <sup>(a)</sup>
Poids de pépins (g)	0,07 ± 0,01 <sup>(a)</sup>	0,06 ± 0,02 <sup>(a)</sup>	0,09 ± 0,04 <sup>(a)</sup>
Longueur de fruit (cm)	1,88 ± 0,40 <sup>(a)</sup>	2,08 ± 0,43 <sup>(a)</sup>	2,02 ± 0,42 <sup>(a)</sup>
Largueur de fruit (cm)	1,70 ± 0,43 <sup>(a)</sup>	1,96 ± 0,38 <sup>(a)</sup>	1,84 ± 0,33 <sup>(a)</sup>
IFF	1,10 ± 0,09 <sup>(a)</sup>	1,06 ± 0,03 <sup>(a)</sup>	1,09 ± 0,06 <sup>(a)</sup>
Pépin /fruit entier	0,017 ± 0,00 <sup>(a)</sup>	0,012 ± 0,00 <sup>(a)</sup>	0,019 ± 0,00 <sup>(a)</sup>
Fruit /pépin	56,67 ± 6,30 <sup>(a)</sup>	80,75 ± 6,20 <sup>(a)</sup>	52,06 ± 9,47 <sup>(a)</sup>

a: groupe homogène par test HSD

Lamare *et al.* (2013) ont expliqué l'augmentation de la longueur, la largeur et le poids de fruit par l'augmentation de la taille des cellules en raison de la division et de l'élongation de ces dernières, ce qui a permis l'accumulation maximale des nutriments.

D'autre part, les ratios pépin/fruit entier et fruit entier/pépin ont été calculés, en effet, le rapport pépin/fruit entier est très faible contrairement au rapport fruit entier/pépin grâce au faible poids des pépins.

#### III.1.2. Paramètres physicochimiques du fruit

Le tableau 4 regroupe les résultats des caractéristiques physicochimiques du fruit en trois stades de maturation.

Tableau 4. Paramètres physicochimiques du fruit aux trois stades de maturation

Paramètres	Stades de maturation		
	FV	FJ	FR
Humidité (%)	66,93 ± 0,83 <sup>(a)</sup>	64,33 ± 2,38 <sup>(a)</sup>	59,73 ± 1,20 <sup>(b)</sup>
Matière sèche (%)	33,06 ± 0,83 <sup>(a)</sup>	35,66 ± 2,38 <sup>(a)</sup>	40,26 ± 1,20 <sup>(b)</sup>
Matière organique (%)	99,73 ± 0,07 <sup>(a)</sup>	99,26 ± 0,30 <sup>(a)</sup>	98,46 ± 0,23 <sup>(b)</sup>
Teneur en cendre (%)	0,26 ± 0,01 <sup>(a)</sup>	0,73 ± 0,30 <sup>(a)</sup>	1,53 ± 0,23 <sup>(b)</sup>
Acidité titrable (%)	0,5 ± 0,01 <sup>(a)</sup>	0,62 ± 0,00 <sup>(b)</sup>	0,74 ± 0,02 <sup>(c)</sup>
pH	3,77 ± 0,01 <sup>(c)</sup>	3,35 ± 0,005 <sup>(b)</sup>	3,29 ± 0,005 <sup>(a)</sup>
SST (°Brix)	19,10 ± 0,02 <sup>(a)</sup>	21,83 ± 0,35 <sup>(b)</sup>	27,00 ± 1,80 <sup>(c)</sup>
Vitamine C (mg / 100 g)	550 ± 0,06 <sup>(c)</sup>	420 ± 0,02 <sup>(b)</sup>	290 ± 0,02 <sup>(a)</sup>
Azote total (%)	0,84 ± 0,04 <sup>(a)</sup>	0,98 ± 0,01 <sup>(b)</sup>	1,04 ± 0,00 <sup>(c)</sup>
Protéines brutes (g/100 g)	5,25 ± 0,1 <sup>(a)</sup>	6,12 ± 0,06 <sup>(b)</sup>	6,51 ± 0,19 <sup>(c)</sup>
Lipides (%)	0,2 ± 0,07 <sup>(a)</sup>	1,9 ± 0,35 <sup>(c)</sup>	1,2 ± 0,08 <sup>(b)</sup>
Sucres totaux (g /100g)	16,62 ± 0,92 <sup>(a)</sup>	17,47 ± 1,15 <sup>(a)</sup>	20,14 ± 0,28 <sup>(b)</sup>
Pectines (%)	0,16 ± 0,01 <sup>(b)</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>(a,b)</sup>	0,13 ± 0,03 <sup>(a)</sup>
Fibres totales (%)	12,04 ± 0,5 <sup>(c)</sup>	8,00 ± 0,23 <sup>(b)</sup>	4,41 ± 0,11 <sup>(a)</sup>

a, b, c : groupes hétérogènes par test HSD

### III.1.2.1. Teneur en eau et en matière sèche

L'eau est un constituant majeur de la plupart des produits alimentaires et joue un rôle important en technologie alimentaire. De plus, il est nécessaire de connaître la teneur en eau pour le calcul de la valeur nutritionnelle des aliments (**Bradley, 2010**).

La teneur en eau des fruits d'*A.unedo* diminue d'une manière significative ( $p < 0,01$ ) en fonction d'avancement vers le stade de maturation de 66,93 ± 0,83 % à 59,73 ± 1,20 % , cette teneur en eau explique la nature périssable du fruit. La teneur en matière sèche augmente par conséquent, du stade vert jusqu'au stade rouge. Selon **Bretaudeau et Fauré (1992)**, c'est la teneur en eau qui tient en dissolution tous les sels minéraux, les sucres, les enzymes et d'autres composés dans les fruits, elle est de l'ordre de 80 à 90% pour les fruits charnus, bien moins élevés mais très variables pour les fruits secs tels que les dattes (5 à 50 %). L'arbouse apparait comme l'un des fruits frais les moins hydratés.

Concernant FR, nos résultats sont semblables et comparables à ceux publiés par **Barros et al. (2010)** et **Özcan et Haciseferoğullari (2007)** qui ont trouvé des valeurs respectives de  $59,7 \% \pm 2,67$  et  $53,72 \% \pm 2,1$ . Cependant, **Vidrih et al. (2013)** ont trouvé une teneur plus faible qui est de  $46,66 \pm 3,88\%$ .

D'après **Vidrih et al. (2013)**, les facteurs qui peuvent influencer la teneur en eau sont l'âge de la plante, la période du cycle végétatif et même des facteurs génétiques. Cette variation peut être due aussi aux différentes conditions environnementales telles que l'exposition aux conditions pédoclimatiques, la répartition géographique et la date de récolte.

#### III.1.2.2. Teneur en cendres et en matière organique

D'après les résultats obtenus (tableau 4), la teneur en matière organique des fruits a diminué au cours de la maturation ( $p < 0,01$ ), par conséquent, la teneur en cendre a augmenté significativement ( $p < 0,01$ ) avec la maturité d'arbousier de  $0,26 \pm 0,01\%$  dans FV à  $1,53 \pm 0,23 \%$  dans FR. Ces résultats est assez représentatif de la présence de minéraux dans ce fruit. Les résultats de la teneur en matière minérale de fruit rouge trouvés par **Özcan et Haciseferoğullari (2007)**, **Ruiz –Rodriquez et al. (2011)** et **Barros et al. (2010)** sont de l'ordre de  $2,82 \% \pm 0,124$ ;  $0,86\% \pm 0,21$  et  $1,71\% \pm 0,09$  respectivement. D'autre part, **González et al. (2011)** et **Doukani et Tabak (2014)** ont trouvé des résultats inférieur de l'ordre de  $0,56\% \pm 0,15$  et  $0,69 \%$  respectivement.

D'une manière générale, selon **Dauthy (1995)**, les sels minéraux des fruits ont une réaction basique ; pour cette raison, la consommation de fruits facilite la neutralisation des réactions nocives de l'acide urique et contribue à l'équilibre acido-basique dans le sang.

#### III.1.2.3. pH et acidité titrable

Les valeurs moyennes du pH et de l'acidité titrable des fruits d'arbousier aux trois stades de maturation sont récapitulées dans le tableau 4.

D'après ces résultats, il apparait que le pH des échantillons a une tendance à diminuer d'une manière hautement significative ( $p < 0,001$ ) de  $3,77$  à  $3,29$  lorsque les fruits passent vers le stade de maturation. D'autre part, l'acidité titrable du fruit augmente de  $0,5 \pm 0,01 \%$  pour FV à  $0,74 \pm 0,02\%$  pour FR ( $p < 0,001$ ). Le caractère acide du fruit est révélé par ces résultats obtenus. L'acidité est l'un des éléments principaux qui déterminent le goût des fruits (**Dauthy, 1995**). De plus, l'augmentation d'acidité pendant la maturation implique la synthèse d'acides organiques, principalement du malate et du citrate, qui peuvent être stockés dans la vacuole en grande quantité (**Etienne et al., 2013**).

Le pH est un paramètre déterminant l'aptitude des aliments à la conservation, il constitue l'un des principaux obstacles, que la flore microbienne doit franchir pour assurer sa prolifération. La plus part des fruits frais ont un pH variant de 3 à 5 (**Diane et al., 2004**). Si on se réfère aux résultats des travaux de **Serçe et al. (2010)** et de **Özcan et Haciseferoğulları (2007)** qui ont trouvé un pH de  $5,57 \pm 0,07$  et de  $4,6 \pm 0,1$  pour le fruit mature respectivement, on constate que ses valeurs sont largement supérieures aux nôtres. Cependant, **González et al. (2011)**, **Ruiz –Rodriquez et al. (2011)** et **Doukani et Tabak (2014)** ont trouvé des pH comparable aux nôtres, qui sont de l'ordre de  $3,50 \pm 0,21$  ;  $3,47 \pm 0,12$ ;  $3,55 \pm 0,054$  et  $3,53 \pm 0,038$  respectivement. D'après la littérature, cette différence peut être expliquée par l'influence des facteurs agro-environnementaux tels que le taux des sels minéraux, la fertilisation, l'approvisionnement en eau et la température (**Etienne et al., 2013**).

D'après **Doukani et Tabak (2014)**, les différences entre le pH sont tributaires d'un grand nombre de facteurs parmi lesquels la région, les conditions climatiques et l'état de la maturation du fruit. La faible valeur du pH de ce fruit peut avoir un grand avantage pour une utilisation industrielle dans la fabrication de jus, confiture et gelée.

Par ailleurs, l'acidité du fruit à maturité est comparable à celle rapportée par **Doukani et Tabak (2014)**, qui était de 0,74 %. Cependant, elle est supérieure à celle trouvée par **Serçe et al. (2010)**, qui était de  $0,67\% \pm 0,17$ . L'acidité titrable donne la mesure de tous les acides d'un aliment, le manque d'acidité rend l'aliment insipide, alors qu'une acidité trop forte lui confère un goût désagréable. Elle nous renseigne aussi sur la quantité de ces acides organiques présents dans l'échantillon (**Etienne et al., 2015**).

Les acides organiques sont, en général des intermédiaires des processus métaboliques, ils influencent la croissance des micro-organismes et affectent la qualité de conservation des produits. Ils sont donc directement impliqués dans la croissance, la maturation et la sénescence du fruit et influent aussi les propriétés sensorielles des fruits (**Al-Farsi, 2005**).

#### **III.1.2.4. Taux des solides solubles totaux**

Les SST représentent l'ensemble de tous les solides dissous dans l'eau, incluant les sucres, les sels, les protéines et les acides carboxyliques. Les résultats de ce paramètre sont groupés dans le tableau 4, où on constate une augmentation de SST au cours de la maturation jusqu'à atteindre  $27,00 \pm 1,8$  °Brix dans le FR ( $p < 0,001$ ). Cette augmentation pourrait être, le résultat de la dégradation de l'amidon pendant l'étape postérieure de la maturité.

**Vidrih et al. (2013)** et **Doukani et Tabak (2014)** ont trouvé des valeurs inférieures aux nôtres en ce qui concerne le fruit mature et qui sont de 21,05 et 17,66 °Brix, respectivement. Par ailleurs, **Müller et al. (2010)** et **Serçe et al. (2010)** ont obtenu des teneurs plus faibles pour le même fruit qui sont de l'ordre de 8,1 et 11,9 ° Brix respectivement.

Des niveaux élevés de solides solubles sont importants pour la commercialisation des fruits frais et pour la transformation. Dans certains fruits, la teneur en solides solubles est utilisée pour indiquer le point de maturation, c'est-à-dire qu'il peut être utile de déterminer le stade de récolte (**Lopes et al., 2001; Nascimento et al., 2008**).

#### III.1.2.5. Teneur en vitamine C

D'après les résultats du tableau 4, il apparaît que la teneur en acide ascorbique diminuait significativement ( $p < 0,01$ ) avec la maturation des fruits, elle est de 550mg/100g pour FV, 420mg/ 100 g pour FJ puis diminue jusqu'à 290mg/100 g pour FR. Le déclin dans le contenu d'acide ascorbique pourrait être attribué à une oxydation de ce dernier. En effet, **Ruiz-Rodriguez et al. (2011)** ont montré l'importance de la date de récolte sur les quantités totales de la vitamine C. Ces résultats montrent que le fruit d'*A.unedo* peut être considéré comme une excellente source de la vitamine C.

D'après **Alarcão-e-Silva et al. (2001)**, la vitamine C est présente à des quantités de 542 mg/100g de fruits non mature et de 346 mg/100 g de fruits mature rouges, d'autre part, **Ruiz-Rodriguez et al. (2011)** ont trouvé des teneurs plus faibles, 262,7mg/100g au stade immature et de 122,0 mg/100 g au stade final de maturation. De plus, **Ben salem et al. (2018)** ont trouvé une concentration largement inférieure de l'ordre de  $48,19 \pm 0,53$  mg/ 100 g dans des fruits complètement mature collectés de Nord-ouest de la Tunisie.

La consommation de tels fruits médicinaux est fortement encouragée pour leurs caractéristiques favorables à la santé, la vitamine C contribue à la formation normale de collagène pour assurer le fonctionnement normal des vaisseaux sanguins, des os, des gencives, des dents, des cartilages et de la peau. Elle accroît également l'absorption de fer, participe au bon fonctionnement des défenses de l'organisme et joue un rôle dans le fonctionnement du système nerveux et des fonctions psychologique, comme elle contribue à protéger les cellules contre le stress oxydatif (**Ben salem et al., 2018**).

#### III.1.2.6. Teneur en azote total et protéines

Les résultats du dosage de l'azote total et des protéines brutes sont donnés dans le tableau 4.

La teneur en azote total des fruits augmente au cours de la maturation ( $p < 0,001$ ), en effet, ils contiennent une concentration plus élevée en azote total au stade final de maturation (FR) (1,04 %) comparativement à celle trouvée par **Seidemann (1995)** qui est de 0,8% et celle trouvée par **Ruiz-Rodríguez et al. (2011)** (0,58 %), mais elle est largement inférieure à celles trouvées par **Özcan et Haciseferoğulları(2007)** et **Barros et al. (2010)** qui sont respectivement de  $3,36 \pm 1,2\%$  et  $3,09 \pm 0,08\%$ .

Les protéines représentent  $6,51 \pm 0,19$  g/ 100 g de FR, leurs concentrations augmentent en fonction de la maturation, elles étaient  $5,25 \pm 0,1$  g/100g de FV puis elles ont passé à  $6,12 \pm 0,06$  g/ 100g de FJ. D'après **Diane et al. (2004)**, les fruits contiennent en générale moins de 1% de protéines à l'exception des noix qui contiennent de 9 à 20%. Les résultats trouvés exposent donc que l'arbose est l'un des fruits les plus riche en protéines.

Ces résultats (pour FR) sont largement supérieurs à ceux obtenus par **Boussalah et al. (2018)** dans l'arbose d'origine Algérien (2,26 à 3,55 g/ 100 g) qui sont dans la même gamme que celles obtenues en Tunisie par **Ben salem et al. (2018)** ( $1,02 \pm 0,40$  g/100 g) et **Masmoudi et al. (2020)** ( $2,5 \pm 0,3$  g/ 100 g).

**Ahren et al. (2019)** ont découvert que les protéines végétales dans l'alimentation peuvent protéger la santé métabolique, avec des liens trouvés entre l'apport en protéines végétales et des marqueurs plus sains de la santé cardiaque et de la gestion de la glycémie. Dans ce contexte, le fruit d'*A.unedo* peut être considéré comme une source importante de protéines végétales dans le régime alimentaire des populations méditerranéennes.

#### III.1.2.7. Teneur en lipides

Les résultats obtenus (tableau 4) ont montré que les fruits d'arbousier sont plus riches en matière lipidique au stade intermédiaire de maturation (FJ) ( $p < 0,001$ ) ( $1,9 \pm 0,35\%$ ), d'autre part, FV contiennent une faible proportion estimée à  $0,15 \pm 0,07\%$  par rapport au FR ( $1,2 \pm 0,08\%$ ). De plus, il est intéressant de noter que la plus grande concentration en matière grasse est portée par les pépins de ce fruit (**Tonelli et Gallouin, 2013**).

Il est important de mentionner que les lipides constituent 1 à 2 % de la majorité des fruits frais, cependant, ils sont très importants car il forment la cire de la surface contribuant à l'apparence du fruit et la couche protégeant le fruit contre la déshydratation et l'attaque des pathogènes (**Diane et al., 2004**).

La teneur en lipides de nos fruits mûrs, est inférieure à celle trouvée par **Özcan et Haciseferoğullari (2007)** ( $2,1\% \pm 0,10$ ), tandis qu'elle est supérieure à celles trouvées par **Ben salem et al.(2018)** et **Boussalah et al.(2018)** qui sont de  $0,51 \pm 0,06\text{g}/100\text{g}$  et  $0,51$  à  $0,89\text{g}/100\text{g}$  respectivement. En outre, **Ruiz-Rodriquez et al. (2011)** ont trouvé des valeurs comprises entre  $0,30\%$  et  $0,78\%$ .

Ces résultats indiquent que l'arbose n'est pas une source de lipides, il n'est donc pas recommandé pour couvrir les besoins énergétiques lipidiques de l'organisme. Par ailleurs, sa consommation est bénéfique pour la santé humaine, étant donné que ce fruit est une source de lipide poly-insaturé en particulier les acides gras essentiels oméga-6 et oméga-9 (**Umaz et Umaz, 2019**).

#### III.1.2.8. Teneur en sucres totaux

Les sucres sont les constituants les plus importants du fruit d'*A.unedo*. Ils sont également responsables de la douceur de cet aliment. Les résultats du tableau 4 ont montré que la teneur en sucres totaux augmente avec la maturation de fruit (de  $16,62 \pm 0,92$  à  $20,14 \pm 0,28\text{g}/100\text{g}$ ). La teneur en sucre varie en fonction du stade de maturation du fruit car la teneur en sucre de la pulpe de fruit est directement liée à la teneur totale en solides solubles (**De Sousa et al., 2012**). D'après ces résultats, le fruit d'*A. unedo* peut être considéré comme une source importante des sucres et d'énergie rapidement disponible.

L'augmentation de la teneur en sucre s'explique par l'hydrolyse progressive de l'amidon sous l'action des amylases (**Fredot, 2017**). De plus, les fruits accumulent les sucres pendant la maturation pour fournir de l'énergie et des nutriments (**Hegedüs et al., 2011**).

Selon **Takrouni et Boussaid (2010)**, la quantité de sucres dans ce type de fruit est variable entre  $14\text{g}/100\text{g}$  de poids sec dans le fruit non mature et  $40,55\text{g}/100\text{g}$  de poids sec au stade final de maturité. Par comparaison, il ressort que les résultats de notre FV sont supérieurs, alors que ceux pour FR sont largement inférieurs. Par ailleurs, **Ruiz – Rodriquez et al. (2011)** et **Ben salem et al. (2018)** ont trouvé une teneur inférieure à la nôtre en ce qui concerne FR qui est de  $14,11\text{g}/100\text{g}$  et de  $10,17\text{g}/100\text{g}$  respectivement.

Ces variations peuvent être attribuées à plusieurs facteurs tels que l'âge de la plante, la charge de l'arbre, le stade de maturation et l'état physiologique du fruit lors de l'analyse (**Ayaz et al., 2000**). D'après **Dorais et al. (2001)**, la concentration en sucres varie en fonction du climat et du stade de maturation, la durée d'exposition au soleil, la disponibilité de l'eau, la teneur en minéraux des sols, l'irrigation et la fertilisation.

#### III.1.2.9. Teneur en pectines

Les résultats montrent que la teneur en pectine a diminué significativement ( $p < 0,05$ ) au cours du développement des fruits d'arbousier, elle représente 0,16 % de FV, 0,15% de FJ et 0,13% de FR.

Par comparaison, FR contient une teneur en pectine hautement supérieure à celles trouvées par **Doukani et Tabak (2014)** qui sont 0,082 % et de 0,064 % pour les échantillons provenant de Tiaret et Tlemcen respectivement, cependant, elle est très faible par rapport à celles trouvées par **Ruiz-Rodriguez et al.(2011)** et **Masmoudi et al.(2020)** qui étaient de 2,95% et 6,1 g/ 100 g de matière sèche respectivement pour le même fruit. Cette différence peut être due aux conditions de culture, et au degré de maturité mais aussi à la méthode de dosage utilisée.

La pectine joue un rôle important dans la consistance du fruit et dans les changements structuraux lors de la maturation et du stockage. Le ramollissement du tissu est attribué à la dégradation enzymatique conduisant à la dépolymérisation des polysaccharides pectiques et à la solubilisation de la proto-pectine (**Inari et al., 2000**).

Sur le plan technologique, la pectine est couramment utilisée pour la production de confitures et de gelées de fruits. Elle peut également être utilisée comme support de substances bioactives dans les systèmes d'administration de médicaments et comme matrice biopolymère pour les engrais à libération lente (**Liu et al., 2007; Bettani et al., 2019**). Cela nous donne une idée sur l'importance d'exploiter les fruits d'*A. unedo* dans la fabrication d'une gamme de produits alimentaires.

#### III.1.2.10. Teneur en fibres totales

Les résultats du dosage des fibres alimentaires d'arboise groupés dans le tableau 4, montrent que la teneur a diminué pendant la maturation. En stade immature, nous avons enregistré une valeur de  $12 \pm 0,05$  %, cette valeur a diminué jusqu'à  $8 \pm 0,23$ % en stade intermédiaire puis à  $4 \pm 0,11$  % en stade final ( $p < 0,001$ ).

La teneur en fibre de FR (4%) est très faible par rapport à celles trouvées par **Doukani et Tabak (2014)**, qui ont publié des chiffres de 19% et 18%. De même, **Ruiz-Rodriguez et al. (2011)** et **Özcan et Haciseferoğullari (2007)** ont trouvé des teneurs supérieures au nôtre, 13,26 % et 6% respectivement.

D'après **Ramlu et Rao (2003)**, la variation de la teneur en fibres peut être due aux différentes conditions telles que la localisation géographique, la constitution génétique, l'état du sol et les



conditions agronomiques et climatiques de la culture et peuvent être aussi affectées par les méthodes de dosage utilisées. Selon **Boussalah et al. (2018)**, la teneur en fibres des arbouses Algériennes était toujours importante. Cela signifie que les arbousiers d'Afrique du Nord pourraient être considérés comme une excellente source de fibres pour les populations humaines, ce qui est d'une grande importance, compte tenu du fait que les régimes alimentaires modernes manquent souvent de fibres alimentaires.

Compte tenu de la recommandation de l'apport en fibres, qui est de 21 à 38 g par jour pour les adultes (**Trumbo et al., 2002**), l'apport de 100 g de fruits d'arbousier pourrait fournir 30 à 44% de la recommandation quotidienne en fibres; et selon les règlements Européens, il pourrait être considéré sous la mention approuvée «riche en fibres» (**European Parliament and Council, 2011**).

Au fil des ans, les fibres alimentaires ont reçu une attention très positive en ce qui concerne leur potentiel en tant qu'aliments fonctionnels, en raison de leur capacité à réduire le cholestérol, le diabète et les maladies coronariennes, la prévention et le traitement de l'obésité et le soulagement de la constipation et la protection contre différents types de cancer (**Zhu et al., 2018**).

Sur le plan industriel, les fibres alimentaires peuvent offrir une multitude de propriétés fonctionnelles lorsqu'elles sont incorporées dans les systèmes alimentaires. Ainsi, l'ajout de fibres contribue à la modification et à l'amélioration de la texture, des caractéristiques sensorielles et de la durée de conservation des aliments en raison de leur capacité de liaison à l'eau, de leur capacité de formation de gel, de leurs effets mimétiques de graisse, anti adhérents, anti-gonflement, texturants et épaississants (**Yangilar, 2013**).

#### **III.2. Phytochimie des EFA pendant la maturation**

Outre les composants dits «traditionnels», les fruits sont des sources riches en composés phytochimiques, également appelés composés bioactifs. Ce groupe englobe une large diversité de composés ayant des degrés variables d'hydroxylation, de méthylation et de glycosylation. Ils agissent généralement comme des écrans solaires, des dissuasifs contre les prédateurs potentiels et des antimicrobiens, et contribuent également à la pigmentation des fruits, à l'astringence et au goût amer de certains produits, ils s'accumulent plus dans la peau que dans la pulpe des fruits (**Mattila et al., 2006**).

#### III.2.1. Teneur en composés phénoliques

Les résultats de dosage des polyphénols totaux et ceux de calcul des rendements d'extraction sont illustrés dans le tableau 5.

##### III.2.1.1. Rendement d'extraction

L'extraction par macération dans le méthanol des composés phénoliques des fruits d'arbousier aux trois stades de maturation, a donné un rendement de 38,38% pour FV, ce rendement a augmenté en fonction de la maturation pour atteindre les 50% sachant qu'il n'y a aucune différence significative entre FJ et FR ( $p > 0,05$ ).

**Oliveira (2010)** a trouvé un rendement d'extraction des substances bioactives des fruits non mûres de  $24,8 \pm 3,8$  %, de  $43,5 \pm 5,5$  % pour les fruits au stade intermédiaire, et  $45,0 \pm 2,2$  % avec les fruits mûres.

**Tableau 5.** Evolution du rendement d'extraction et teneur en polyphénols totaux durant la maturation

	Stades de maturation		
	FV	FJ	FR
<b>Rendement d'extraction (%)</b>	$38,38 \pm 1,34^{(b)}$	$50,13 \pm 0,84^{(a)}$	$49,06 \pm 2,12^{(a)}$
<b>Phénol totaux (mg EAG /gE)</b>	$10,18 \pm 0,56^{(c)}$	$36,04 \pm 0,56^{(b)}$	$72,93 \pm 0,36^{(a)}$
<b>Flavonoïdes (mg EQ/ gE)</b>	$8,78 \pm 0,83^{(c)}$	$23,01 \pm 3,15^{(b)}$	$29,12 \pm 0,69^{(a)}$
<b>Tanins condensés (mg EC/ gE)</b>	$17,77 \pm 1,17^{(a)}$	$14,33 \pm 0,33^{(b)}$	$11,88 \pm 1,26^{(b)}$

a, b, c : groupes hétérogènes par test HSD

##### III.2.1.2. Phénols totaux

Selon les résultats illustrés dans le tableau 5, nous constatons que les FR sont les plus riches en phénols totaux ( $72,93 \pm 0,36$  mg EAG/g E) par rapport aux FJ ( $36,04 \pm 0,56$  mg EAG/g E) et FV ( $10,18 \pm 0,56$  mg EAG/g E) ( $p < 0,001$ ), ce qui nous laisse conclure que la concentration en phénols totaux augmente avec la maturation des fruits.

**Oliveira et al. (2011)** ont obtenu un contenu maximal en polyphénols de 48,26 g EAG/ kg d'extrait dans le stade intermédiaire de maturation, tandis que les fruits non mûrs et mûrs contenaient des teneurs de  $25,4 \pm 2,5$  et  $26,8 \pm 2,4$  g EAG/ kg MS respectivement. D'autre part **Alarcão-e-Silva et al. (2001)** ont obtenu une concentration de  $15,5 \pm 0,6$  g EAG/ kg MS des fruits non mûres, et  $14,6 \pm 0,9$  g EAG/ kg MS des fruits mûres.

La teneur en ces composés des FR est supérieure à ceux trouvés par **Alarcão-e-Silva et al. (2001)**, **Tavares et al. (2010)** et **Orak et al. (2011)** qui sont de l'ordre de  $15,5 \pm 0,6$  mg EAG/g, 18 mg EAG/g et 14,29 mg EAG/g E respectivement. Cependant **Barros et al. (2010)** et **Moualek et al. (2016)** ont trouvé des valeurs plus élevée de l'ordre de 126,83 mg EAG/g E et  $207,84 \pm 15,03$  mg EAG /g E respectivement.

Des études faites par **Falleh et al. (2008)** et **Podsdek (2007)** ont montré que la teneur en composés phénoliques d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques ; les conditions climatiques, les pratiques culturelles, le degré de maturité, les conditions de stockage, la méthode d'extraction et la méthode de quantification.

Les fruits sont une bonne source de composés à fonctionnalité phénolique, notamment les phénols, les lignines, les lignanes, les coumarines, les tanins, les acides phénoliques et les flavonoïdes qui sont importants dans l'alimentation humaine (**Xu et al., 2017**). Ces molécules jouent généralement un rôle essentiel dans les mécanismes de défense des plantes, notamment les attaques d'agents pathogènes ou d'insectes, la lumière ultraviolette et les dommages mécaniques chez les plantes. Ils jouent également un rôle important dans la santé humaine, protégeant contre les dommages induits par les espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote (**Khoddami et al., 2013**).

#### III.2.1.3. Flavonoïdes

Les résultats du dosage des flavonoïdes représentés dans le tableau 5 montrent que les valeurs moyennes de la teneur en ces composés des fruits d'arbousier augmentent d'une manière significative ( $p < 0,001$ ), de  $8,78 \pm 0,83$  mg EQ/g E dans les FV à  $29,12 \pm 0,69$  mg EQ/g E dans les FR dont la valeur moyenne est enregistrée pour les FJ ( $23,01 \pm 3,15$  mg EQ/g E).

**Barros et al. (2010)** et **Gulen et al. (2012)** ont trouvé des concentrations en flavonoïdes allant jusqu'à 34,99 mg/g E et  $3,05 \pm 0,04$  mg /gE respectivement dans le fruit mature. D'une manière générale, la teneur en flavonoïdes de nos fruits est supérieure à celles de quelques autres fruits sauvages étudiés par **Gulen et al. (2012)** à savoir *Lycium europaeum* L. (3,72 mg/100gE), *Prunus spinosa* L. (1,74 mg/100 gE), *Rosa canina* L. (1,69 mg/100g E) et *Rubus sanctus* L. (1,88 mg/100gE).

Le degré de maturité des fruits influence nettement la quantité des composés phénoliques. La dégradation de certains composés phénoliques peut être plus rapide ou plus lente que la biosynthèse d'autres composés. Selon certains auteurs, la teneur en acides phénoliques

diminue pendant la maturation, alors que la teneur en flavonoïdes augmente (**Manach et al., 2004**).

Les flavonoïdes sont omniprésents chez tous les végétaux et leur activité est exprimée par leur grande affinité biologique avec les polymères, les métaux lourds et surtout pour leur activité antioxydante. Ce sont les plus actifs parmi les antioxydants végétaux alimentaires. Ils ont en outre une action thérapeutique sur certaines pathologies telle le traitement des inflammations, des infections virales et du cancer (**Moller, 2003 ; Ndhlala et al., 2006**).

#### III.2.1.4. Tanins condensés

Les résultats du tableau 5 nous ont permis de conclure que la teneur en tanins condensés des fruits diminue significativement ( $p < 0,05$ ) durant la maturation. Elle était de  $17,77 \pm 1,17$  mg EC/g E en stade immature (FV) et de  $11,88 \pm 1,26$  mg EC/g E au stade final de maturation (FR). Nos résultats sont largement supérieurs à ceux de **Gulen et al. (2012)** qui ont trouvé une teneur de  $0,315 \pm 0,312$  mg EC/gE. Par ailleurs, **Alarcão-e-Silva et al. (2011)** ont rapporté que la teneur des tanins condensés diminuait lors de la maturation d'arbousier de 0,313 mg/g du poids sec du fruit vert à 0,175 mg/g de poids sec de celui mature.

Le goût des arbousiers est trop astringent quand les fruits sont verts et devenant comestible quand ils atteignent l'étape de maturation, ce goût amer peut être attribué à la teneur élevée en tanins (**Oliveira et al., 2011**).

En comparant le taux de tanins condensés du fruit d'*A. unedo* avec d'autres fruits sauvages, on constate que la teneur en ces molécules est plus élevée par rapport au prunellier (*Prunus spinosa L.*) et au mûre (*Rubus sanctus L.*) qui présentent des teneurs de  $0,952 \pm 0,112$  mg EC/g et  $0,142 \pm 0,246$  mg EC/g d'extrait respectivement (**Barros et al., 2010**).

D'après les résultats de la détermination de la teneur en composés phénoliques, le fruit d'*A. unedo* peut être considéré comme une source importante de ces derniers, la consommation de tel fruit de bois donne un plus à la santé de consommateur en le protégeant contre plusieurs maladies, l'ajout de ce fruit ou de ses extraits dans des aliments est favorable aussi pour obtenir des aliments fonctionnel.

#### III.2.2. Activités antioxydantes des EFA

##### III.2.2.1. Capacité antioxydante totale

Les résultats de l'évolution de la capacité antioxydante totale (CAT) en fonction de différentes concentrations des trois extraits sont résumés dans la figure 8. Nous constatons

### III. Résultats et Discussion

que la capacité antioxydante augmente avec l'augmentation de la concentration des EFA aux trois stades de maturation.

D'autre part, EC50 est la concentration d'extrait fournissant 50% de l'inhibition du piégeage des radicaux. Une valeur EC50 plus basse indique une activité antioxydante plus élevée. La figure 9 représente les valeurs d'EC 50 correspondants à l'activité antioxydante totale des trois EFA où il est clair que l'EFR est le plus actif ( $p < 0,001$ ) avec une EC 50 de  $0,06 \pm 0,01$  mg/ml.

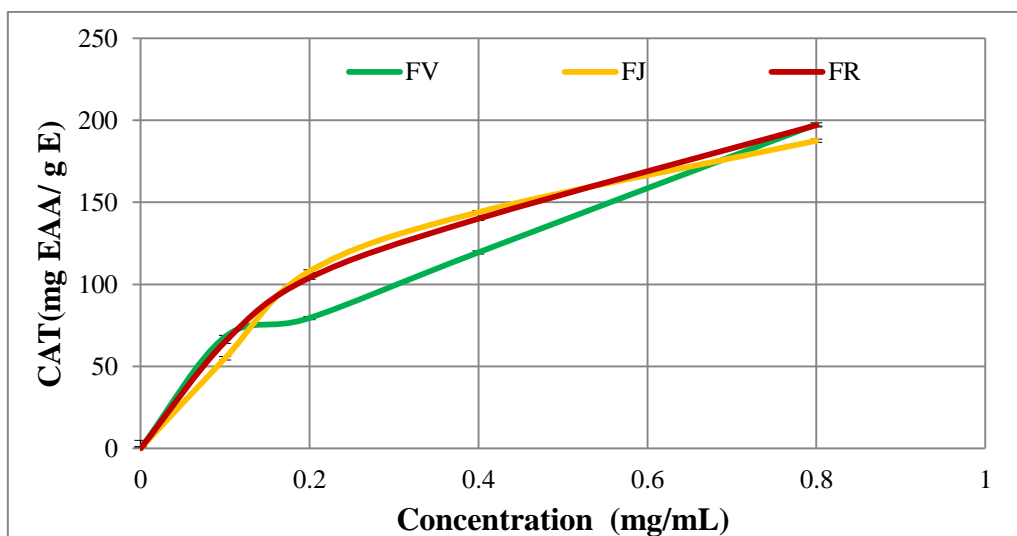


Figure 8. CAT de l'EFA à différentes concentrations: <sup>(FV)</sup> fruit vert, <sup>(FJ)</sup> fruit jaune, <sup>(FR)</sup> fruit rouge

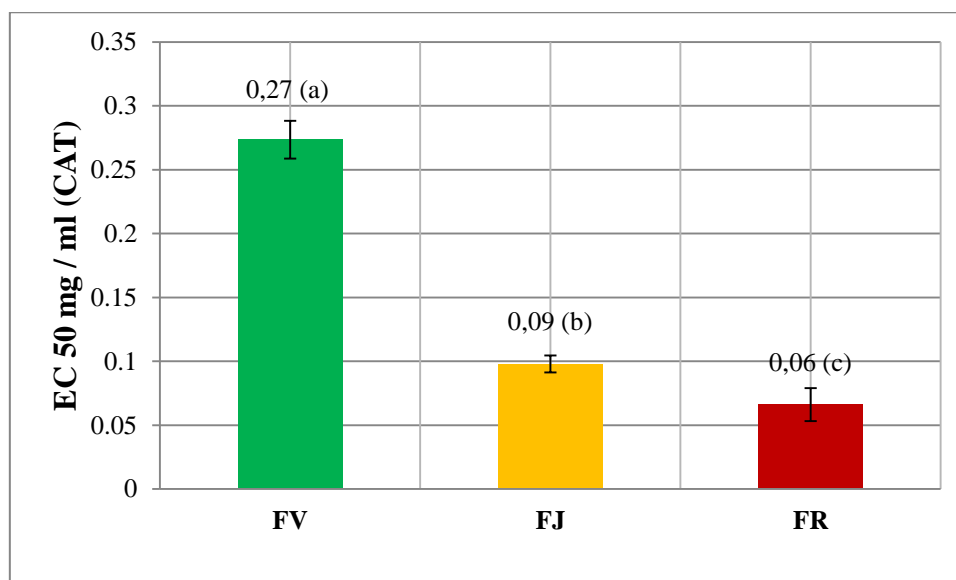
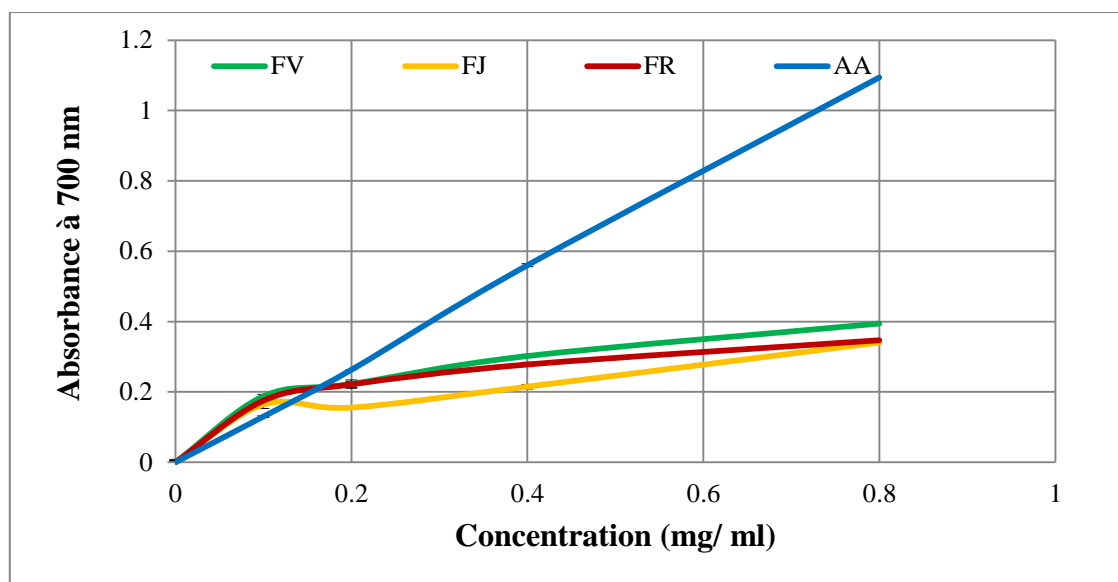


Figure 9. EC50 de l'EFA pour l'activité antioxydante totale: <sup>(FV)</sup> fruit vert, <sup>(FJ)</sup> fruit jaune, <sup>(FR)</sup> fruit rouge, <sup>(a, b, c)</sup> groupes hétérogènes par test HSD

#### III.2.2.2. Réduction du fer

La figure 10 regroupe les résultats de l'étude du pouvoir réducteur des EFA aux trois stades de maturation. Une augmentation de l'absorbance du mélange réactionnel indiquerait une augmentation de la capacité réductrice due à une augmentation de la formation du complexe.



**Figure 10.** FRAP de l'EFA à différentes concentrations: <sup>(FV)</sup> fruit vert, <sup>(FJ)</sup> fruit jaune, <sup>(FR)</sup> fruit rouge, <sup>(AA)</sup> acide ascorbique

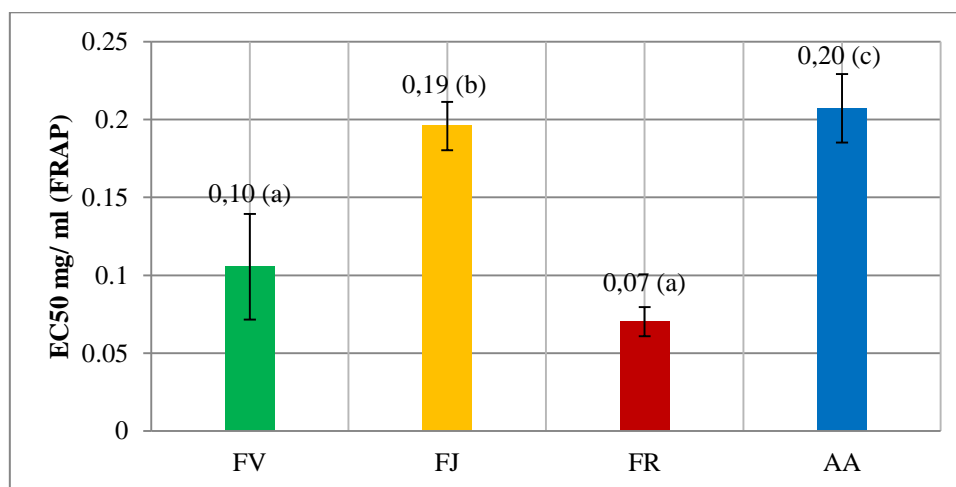
En analysant la figure ci-dessus, il apparaît clairement que l'absorbance de différents EFA augmente lentement avec la concentration, pour l'EFR, cela peut être expliqué par son richesse en acide caféique, acide férulique et la quercétine (**tableau 6**), qui possèdent ce caractère de réagir lentement même après plusieurs heures de temps de réaction (**Gulcin, 2020**).

L'activité antioxydante des composés phénoliques est principalement due à leurs propriétés redox, qui peut jouer un rôle important en absorbant et en neutralisant les radicaux libres (**Chung et al., 2002**).

Le pouvoir réducteur des fruits d'arbousier est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants peuvent être considérés comme réducteurs et inhibiteurs des oxydants (**Siddhuraju et Becker, 2007**).

### III. Résultats et Discussion

Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (**Jeong et al., 2004**).



**Figure 11.** EC50 de l'EFA pour le pouvoir réducteur: <sup>(FV)</sup> fruit vert, <sup>(FJ)</sup> fruit jaune, <sup>(FR)</sup> fruit rouge, <sup>(AA)</sup> acide ascorbique, <sup>(a, b, c)</sup> groupes hétérogènes par test HSD

La figure **11** représente les EC50 de différents EFA comparativement à l'acide ascorbique où on constate que le FR présente la plus basse EC 50 (0,07 mg / ml) ce que signifie qu'il possède la meilleure capacité à réduire le fer ferrique en fer ferreux ( $p < 0,05$ ). Par contre, **Oliveira et al. (2011)** ont démontré que la plus haute puissance réductrice est attribuée aux fruits au stade intermédiaire de maturation.

**Takwa et al. (2018)** ont trouvé une valeur d'EC 50 de 0,32 mg/ml avec le fruit mature collecté dans le parc naturel du territoire de Montesinho au Nord-Est du Portugal.

#### III.2.2.3. Piégeage du radical libre DPPH<sup>•</sup>

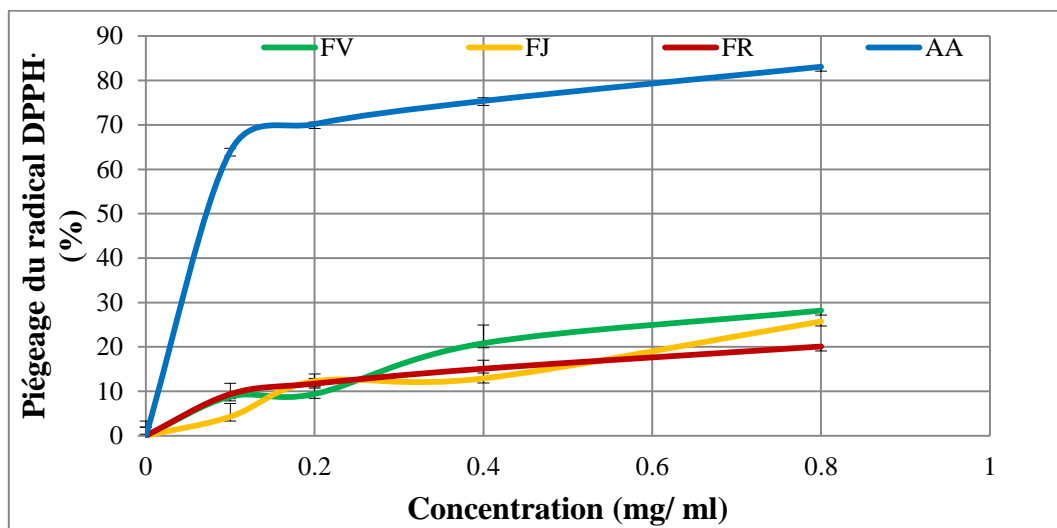
Les résultats de piégeage de ce radical par les différents EFA et par l'acide ascorbique utilisé comme standard ainsi que les EC 50 correspondants sont récapitulés dans les figures **12** et **13** respectivement.

Il est clair d'après les résultats obtenus que tous les EFA sont capables de neutraliser le radical DPPH<sup>•</sup>, en outre, cette capacité accroit généralement avec la concentration des extraits. Par comparaison avec le pouvoir inhibiteur de l'acide ascorbique, nous pouvons remarquer que les EFA présentent une modeste capacité à piéger le radical DPPH<sup>•</sup> qui se traduit par un maximum de  $28,18 \pm 1,63$  % enregistré avec l'EFV à 0,8mg/ml. En effet, cette remarque a

### III. Résultats et Discussion

été confirmée après le calcul des EC 50 où celle de l'acide ascorbique (0,07 mg / ml) a été largement plus faible ( $p < 0,001$ ) que celle de nos extraits.

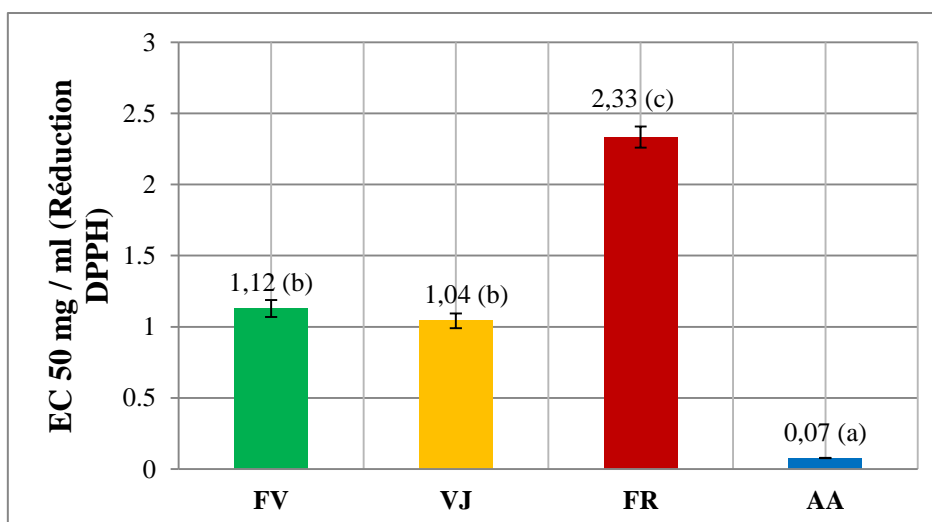
Selon **Shahidi et Zhong (2015)**, certains composés absorbent dans la même gamme de longueurs d'onde que le DPPH à savoir les anthocyanes qui ont une forte absorption dans la gamme de longueurs d'onde similaire (500–550 nm) à celle de la DPPH, et peuvent donc introduire des interférences avec les résultats et leur interprétation.



**Figure 12.** Piégeage du radical libre DPPH<sup>•</sup> par l'EFA à différentes concentrations: <sup>(FV)</sup> fruit vert, <sup>(FJ)</sup> fruit jaune, <sup>(FR)</sup> fruit rouge, <sup>(AA)</sup> acide ascorbique

Par ailleurs, de nombreux composés antioxydants à haut poids moléculaire qui réagissent rapidement avec les radicaux libre peuvent réagir lentement ou peuvent même être inertes avec le DPPH. De plus, les mesures spectrophotométriques peuvent être affectées par des composés, tels que les caroténoïdes, qui absorbent à la longueur d'onde de détermination ainsi que par la turbidité de l'échantillon (**Gulcin, 2020**).





**Figure 13.** EC 50 de l'EFA pour le piégeage de radical DPPH<sup>•</sup>: <sup>(FV)</sup> fruit vert, <sup>(FJ)</sup> fruit jaune, <sup>(FR)</sup> fruit rouge, <sup>(AA)</sup> acide ascorbique, <sup>(a, b, c)</sup> groupes hétérogènes par test HSD

L'influence du stade de maturation sur l'activité antioxydante mesurée par la méthode DPPH a également été prouvée par **Oliveira et al. (2011)**, les fruits d'arbousier au stade intermédiaires (EC50 = 0,37 mg/ml) et au stade mûrs (EC50 = 0,25 mg/ml) possédaient une activité antioxydante plus élevée que les fruits non mûrs (EC50 = 0,58 mg/ml).

**Ben salem et al. (2018)** et **Masmoudi et al. (2020)** ont trouvé des valeurs d'EC50 moins élevée avec l'extrait de fruit mature qui sont de l'ordre de  $0,32 \pm 0,01$  mg/ml et  $0,31 \pm 0,01$  mg / ml respectivement comparativement à notre extrait ( $2,33 \pm 0,74$  mg/ml). Cependant, selon **Moualek et al. (2016)**, l'EC50 pour l'extrait anhydre était de  $2,359 \pm 0,091$  mg/ml, pour l'extrait aqueux, cette valeur s'est avérée supérieure (EC50 =  $7,956 \pm 0,278$ ) mg/ml.

De plus, l'activité antioxydante des baies mature d'*A. unedo* collectés de différentes régions Portugaises variait entre  $0,278 \pm 0,02$  et  $0,589 \pm 0,01$  mg/ml (**Fonseca et al., 2015**).

La capacité antioxydante des extraits de fruits rapportée par **Isbilir et al. (2012)** était plus élevée lorsqu'ils étaient obtenus à partir de fruits entièrement rouges. Les concentrations d'extraits de fruits rouges et jaunes fournissant 50% d'activité antioxydante (EC50), elles étaient de 0,409 et 0,499 mg/ml, respectivement.

#### III.2.2.4. Activité antioxydante mesurée par le radical cation ABTS<sup>+</sup>

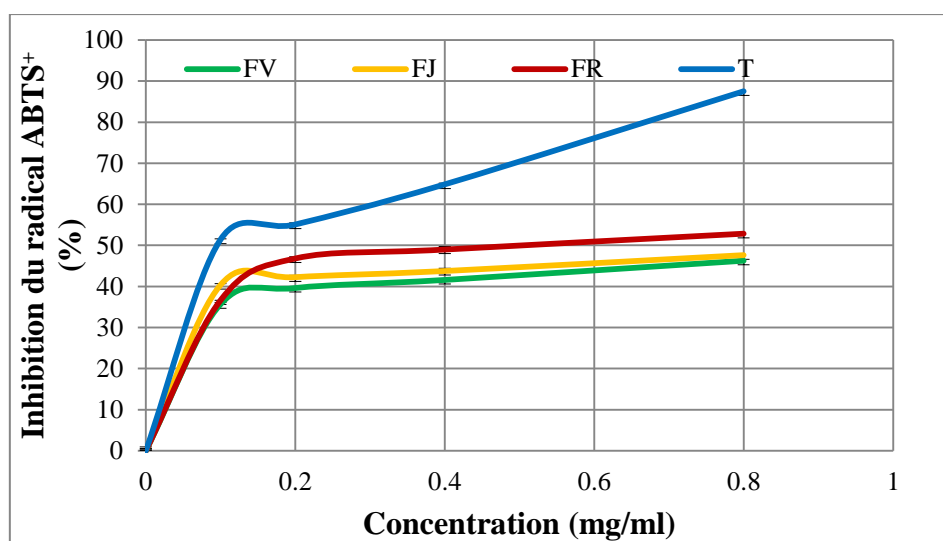
Les valeurs des pourcentages d'inhibition du radical libre ABTS<sup>+</sup> et celle des EC 50 pour les EFA sont représentées par les figures 14 et 15 respectivement.

L'analyse des résultats illustrés par la figure 14 montre que tous les EFA sont capable de piéger le radical libre ABTS<sup>+</sup>, cette capacité est proportionnelle avec les concentrations des

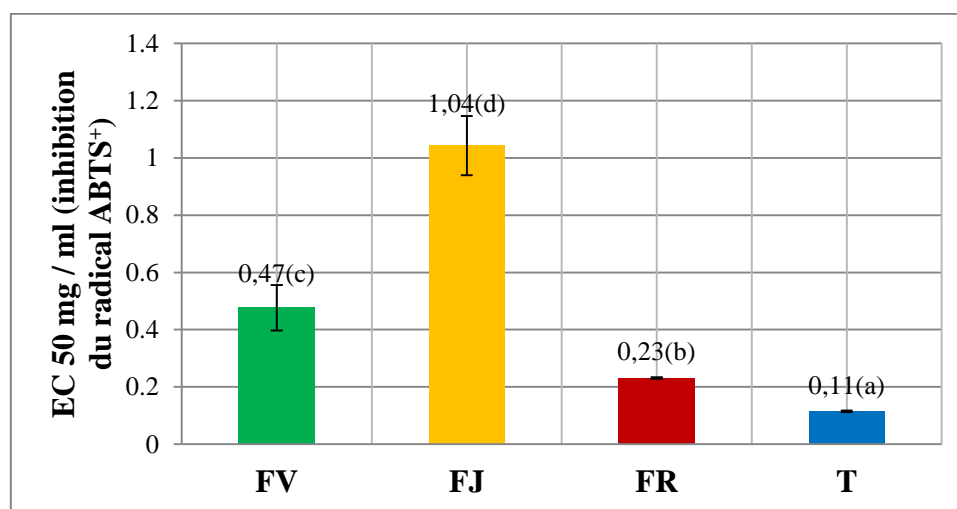
### III. Résultats et Discussion

extraits. D'autre part, et comparativement avec le Trolox, les meilleurs résultats d'inhibition ont été trouvés avec l'EFA, ce résultat a été confirmé après le calcul des EC50 (figure 15). Par ailleurs, cette activité d'inhibition que possède l'EFA (0,23 mg/ml) reste inférieure à celle de Trolox qui peut inhiber 50 % de l'activité du radical libre ABTS<sup>+</sup> à concentration de 0,11mg/ml. Dans ce contexte, **Ben salem et al. (2018)**, ont trouvé une valeur de EC50 avec le fruit mature plus élevée (0,51 ± 0,006 mg/ml) que la nôtre.

**Çakmak et al. (2016)** ont trouvé une capacité antioxydante mesurée par la méthode ABTS de 21,10 ± 0,01 mM eq Trolox/g dans le fruit mature frais.



**Figure 14.** Inhibition du radical libre ABTS<sup>+</sup> par l'EFA à différentes concentrations : <sup>(FV)</sup> fruit vert, <sup>(FJ)</sup> fruit jaune, <sup>(FR)</sup> fruit rouge, <sup>(AA)</sup> acide ascorbique, <sup>(T)</sup> trolox



**Figure 15.** EC50 de l'EFA pour l'inhibition du radical ABTS<sup>+</sup>: <sup>(FV)</sup> fruit vert, <sup>(FJ)</sup> fruit jaune, <sup>(FR)</sup> fruit rouge, <sup>(T)</sup> trolox, <sup>(a, b, c, d)</sup> groupes hétérogènes par test HSD

#### III.2.2.5. Piégeage du peroxyde d'hydrogène

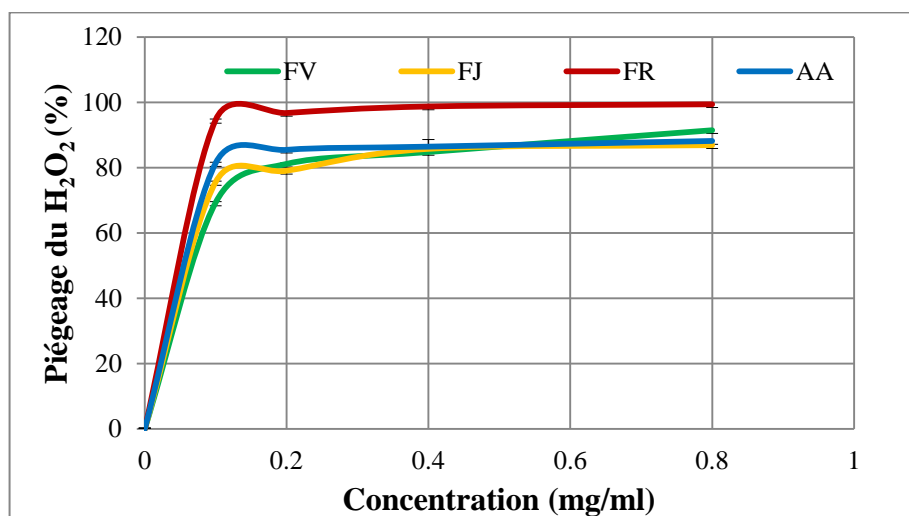
La capacité des extraits des fruits d'*A. unedo* à piéger le peroxyde d'hydrogène est représentée par la figure 16.

Il est clair d'après les résultats obtenus que les EFA présentent une forte capacité à piéger le peroxyde d'hydrogène, cette capacité est proportionnelle à la concentration des extraits.

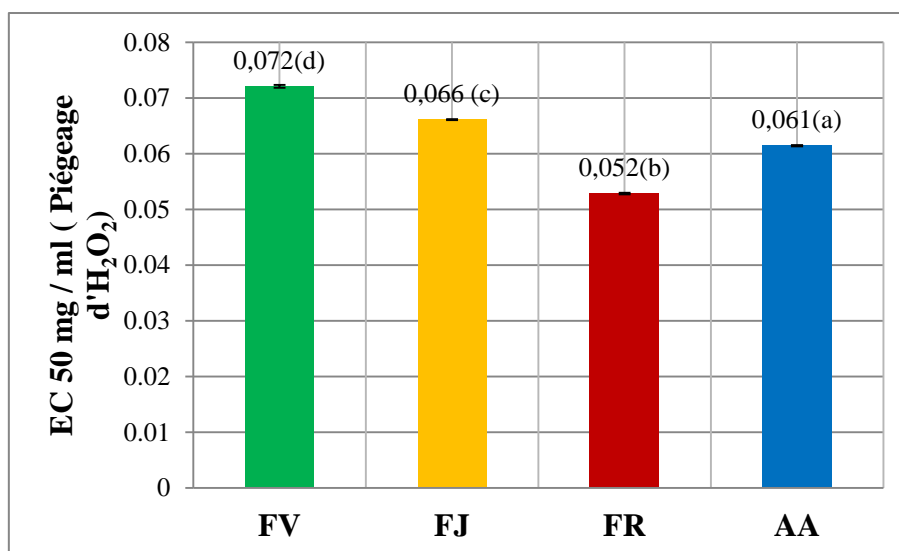
Les valeurs EC50 correspondantes au piégeage d' $H_2O_2$  sont illustrées par la figure 17. D'après cette dernière, il est clair que le piégeage de peroxyde d'hydrogène est significativement affecté par le stade de maturité ( $p < 0,001$ ) où l'EFV a montré la plus basse activité de piégeage d' $H_2O_2$  ( $EC_{50} = 0,072$  mg /ml), tandis que l'EFR a montré la plus haute activité qui s'est traduit par une valeur d' $EC_{50}$  de l'ordre de 0,052 mg/ml.

En outre, l'EFR présente aussi une capacité à piéger le peroxyde d'hydrogène plus élevée que celle de l'acide ascorbique utilisé comme un antioxydant de référence.

La capacité de piégeage du  $H_2O_2$  déterminée par **Isbilir et al. (2012)** était faible, 27,10% et 25,86% pour les extraits de fruits verts et rouges, respectivement.



**Figure 16.** Inhibition du  $H_2O_2$  par l'EFA à différentes concentrations : <sup>(FV)</sup> fruit vert, <sup>(FJ)</sup> fruit jaune, <sup>(FR)</sup> fruit rouge, <sup>(AA)</sup> acide ascorbique



**Figure 17.** EC<sub>50</sub> de l'EFA pour le piégeage du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: <sup>(FV)</sup> fruit vert, <sup>(FJ)</sup> fruit jaune, <sup>(FR)</sup> fruit rouge, <sup>(AA)</sup> acide ascorbique, <sup>(a, b, c, d)</sup> groupes hétérogènes par test HSD

Outre la manipulation des fruits et les conditions environnementales post-récolte, l'accumulation et la dégradation des composés antioxydants des fruits pendant le processus de maturation peuvent également être attribuées à des facteurs génétiques et environnementaux, tels que le cultivar, les pratiques culturales et le stade de développement (Vicente et al., 2009).

En générale, pour la majorité des activités antioxydantes mesurées (en exceptant le piégeage du radical libre DPPH), l'EFR présente les plus faibles EC<sub>50</sub> et par conséquent les meilleures activités antioxydantes. Ces résultats peuvent être liés à l'augmentation de la teneur en anthocyanes, responsable de la couleur des fruits, à mesure qu'ils mûrissent. Ces composés sont connus comme de puissants antioxydants (D'Archivio et al., 2007).

En outre, l'augmentation de la teneur en sucres, qui intervient lors de la maturation des fruits, pourrait également être un facteur contribuant à ces résultats, car certains sucres peuvent agir comme des agents réducteurs, à savoir le fructose (Oliveira et al., 2011).

Les activités des antioxydants dépendent non seulement de leurs caractéristiques structurales, mais également de nombreux autres facteurs, tels que la concentration, la température, le niveau de lumière, le type de substrat, l'état physique du système, ainsi que sur les nombreux microcomposants agissant comme prooxydants ou synergistes (Gulcin, 2020).

De plus, les résultats de la littérature montrent clairement que l'activité antioxydante est fortement dépendante de la méthode de détermination choisie et qu'une corrélation complète peut ne pas être observée entre les activités antioxydantes (**Balkan et al., 2020**).

Sur le plan sanitaire, la consommation de fruits et légumes riches en antioxydants a été associée à un risque réduit de certaines maladies chroniques, des études épidémiologiques ont démontré une association inverse entre la consommation de fruits et légumes et la mortalité due à des maladies liées à l'âge, telles que les maladies coronariennes et le cancer, qui peut être attribuée à leur activité antioxydante (**Ganesan et al., 2011**).

Sur le plan technologique, la capacité antioxydante des fruits d'arbousier a conduit à l'application de leurs extraits riches en composés phénoliques comme ingrédients fonctionnels dans les produits carnés transformés (**Armenteros et al., 2013 ;Ganhão et al., 2013**).

Par ailleurs, **Takwa et al. (2018)** ont montré que le pain incorporé avec l'extrait de fruit d'*A.unedo* riche en catéchine a présenté une capacité antioxydante plus élevée que les pains incorporés avec de l'acide ascorbique et du sorbate de potassium. Ces résultats obtenus démontrent que cet extrait pourra être utilisé dans le développement de nouveaux pains remplaçant les conservateurs synthétiques, sans interférer avec les caractéristiques nutritionnelles.

#### **III.3. Composition d'EFR analysé par HPLC-DAD**

Les concentrations des composés phénoliques (mg/ml) présents dans l'EFR sont présentées dans le tableau 6. Seize composés phénoliques standards ont été analysés par HPLC-DAD et dix d'entre eux ont été identifiés dans l'extrait.

La classe la plus abondante de composés phénoliques était les flavonoïdes, et la procyanidine B2 était le composé le plus concentré dans l'EFR (5,77 mg / ml); d'autres flavonoïdes, tels que la quercétine -3-O-glucoside, la rutine, la mirécitine et l'apigénine-7-O glucoside, ont été détectés à des concentrations plus faibles.

En ce qui concerne les acides phénoliques, l'acide gallique était le plus abondant (4,544 mg / ml), tandis que les acides férulique, caféique et vanillique ont été présents à des concentrations plus faibles (tableau 6). La catéchine était le seul tanin détecté à une concentration de 0,285 mg / ml.

**Tableau 6.** Identification et quantification des composés phénoliques présents l'EFR par LC-DAD

Composés phénoliques	Concentration (mg/ml)	Composés phénoliques	Concentration (mg/ml)
Acide férulique	0,002	Quercétine -3-O-glucoside	0,431
Acide caféique	0,006	Quercétine	nd
Acide gallique	4,544	Rutine	0,428
Acide vanillique	0,013	Mirécitine	0,020
Acide chlorogénique	nd	Apigénine-7-O glucoside	0,044
Catéchine	0,285	Naringénine	nd
Gallocatéchine gallate	n.d	Apigénine	nd
Procyanidine B2	5,770	Kaempférol	nd

nd: non détecté

Des études précédentes ont été menées pour caractériser la composition phénolique d'*A. unedo* d'Espagne, du Portugal et d'Italie (**Pawlowska et al., 2006; Pallauf et al., 2008; Tavares et al., 2010**). Dans leur étude sur les fruits Tunisiens pleinement mûrs, **Ben salem et al. (2018)** ont constaté que la fraction phénolique était dominée par les dérivés du galloyle. Flavonols (quercétine, quercétine-3-rutinoside, quercétine-3-le xyloside, et quercétine-3-rhamnoside), la catéchine, l'épicatéchine et le dimère de procyanidine étaient également trouvés dans l'EFR.

**Tavares et al. (2010)** ont découvert dans leurs échantillons que les dérivés d'acide gallique étaient les composés phénoliques les plus abondants, tandis que **Guimarães et al. (2013)** ont constaté que la catéchine était le composé le plus abondant pour les variétés Portugaises. Ces différences étaient probablement dues aux méthodes analytiques utilisées.

Plus récemment, **Masmoudi et al. (2020)** ont trouvé que les acides phénoliques et leurs dérivés, ainsi que certains flavonoïdes étaient les principaux composés phénoliques trouvés dans l'extrait méthanolique du fruit mature d'*A. unedo*. L'acide quinique était le principal composé phénolique (96% du total des composés phénoliques identifiés) suivi de la catéchine (2,2%) et de l'acide gallique.

Des composés de flavan-3-ol, y compris des composés de catéchine, ont été précédemment trouvés par **Pallauf et al. (2008)**. Selon **Albuquerque et al. (2017<sup>a</sup>)** et **Guimarães et al. (2013)**, les fruits d'*A. unedo* sont considérés comme une source potentielle de ces composés.

La catéchine a été largement utilisée dans le domaine nutraceutique et pour l'enrichissement des aliments (Albuquerque et al., 2017<sup>a</sup>).

L'acide gallique est un dérivé d'acide hydroxybenzoïque. C'est un composant intermédiaire du métabolisme végétal représentant une grande famille de métabolites polyphénoliques secondaires végétaux qui sont associés à de nombreuses actions biologiques, comme antioxydant, antimicrobien et antitumoral entre autres (Locatelli et al., 2009).

En effet, il est connu pour sa toxicité relative vis-à-vis des microorganismes: en particulier, il a une puissante activité antibactérienne, la cible principale étant la membrane cellulaire bactérienne qui conduit à des changements irréversibles de perméabilité, de rupture et de formation de pores (Borges et al., 2013). Les procyanidines exercent également une activité antibactérienne élevée sur diverses bactéries pathogènes et constituent le polyphénol le plus efficace contre *Escherichia coli* (Tang et al., 2017).

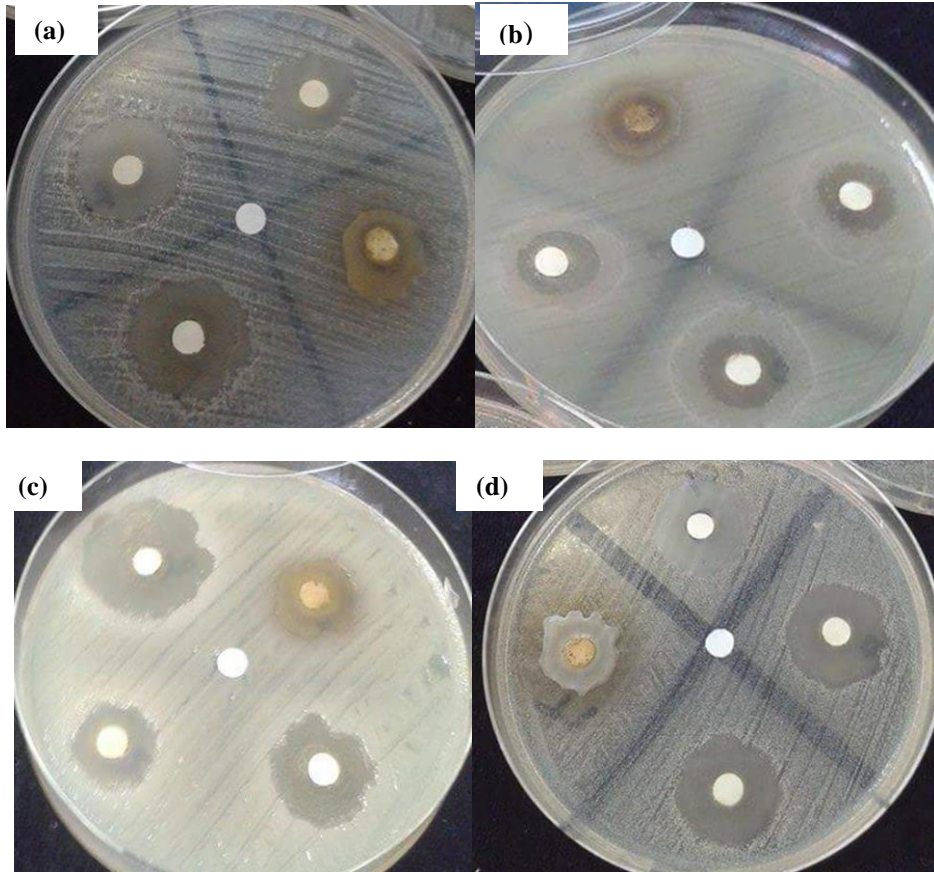
#### III.4. Activité antimicrobienne des EFA

L'activité antimicrobienne *in vitro* des EFA aux trois stades de maturation a été étudiée, les résultats des diamètres des zones d'inhibition sont illustrés dans le tableau 7.

Tous les extraits ont montré une activité antimicrobienne vis-à-vis des bactéries Gram positive et Gram négative ainsi que les moisissures mise au test. La présence des zones d'inhibition est le résultat d'un antagonisme exercé par les substances bioactives présents dans les EFA envers les souches cibles. Les diamètres des zones d'inhibition étaient compris entre 14,66 mm et 21 mm pour l'EFV, entre 13 mm et 26 mm pour l'EFJ et entre 10,33 mm et 26 mm pour l'EVR (figures 18 et 19).

L'analyse statistique a révélé une différence hautement significative ( $p < 0,001$ ) entre l'activité antimicrobienne envers chaque souche microbienne et le type d'extrait. De plus, l'EFJ a exercé l'effet antibactérien le plus élevé sur les souches Gram positives ( $p < 0,001$ ). En revanche, les souches à Gram négatif étaient plus sensibles à l'EFV ( $p < 0,001$ ).

À notre connaissance, aucune étude n'a rapporté l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanoliques des fruits d'*A. unedo* aux différents stades de maturation.

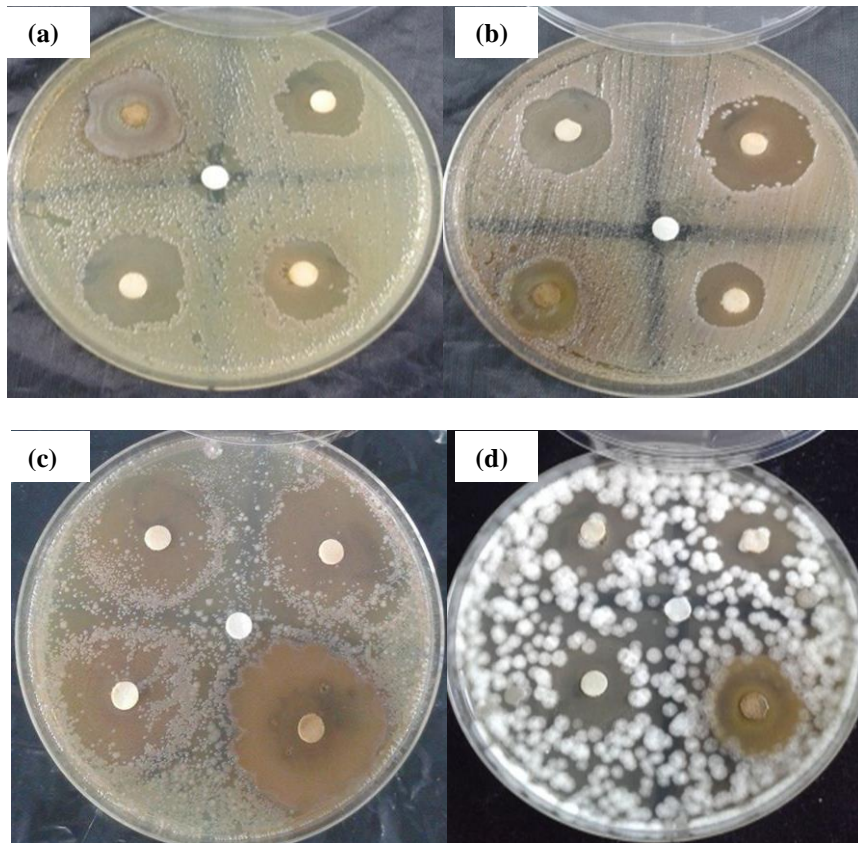


**Figure 18.** Activité antibactérienne des EFA aux trois stades de maturation : <sup>(a)</sup>*P. aeruginosa*, <sup>(b)</sup>*Salmonella.sp*, <sup>(c)</sup>*S. aureus*, <sup>(d)</sup>*E.coli*

**Ben salem et al. (2018)** ont trouvé que l'extrait éthanolique du fruit mature a montré une forte activité antimicrobienne contre *S. aureus* (ATCC 6538), *B. subtilis* (ATCC 23857) et *P. aeruginosa* (ATCC 2785), une activité antimicrobienne modérée contre *S. typhimurium* (ATCC 14028), *E. coli* (ATCC 8739), *Enterococcus faecium* (ATCC 19434) et *Candida albicans* (ATCC 10231) et une faible activité vis-à-vis de *Streptocoque B* (ATCC 13813).

En outre, un extrait représentatif des feuilles d'*A. unedo*, préparé à partir des extraits aqueux des feuilles de 19 génotypes végétaux étudiés par **Malheiro et al. (2012)**, a été testé contre quatre bactéries Gram-positives (*B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus* et *S. epidermis*), deux bactéries à Gram négatif (*E. coli* et *P. aeruginosa*) et levures (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* et *C. glabrata*), l'extrait a présenté une activité antimicrobienne vis-à-vis de toutes les bactéries testées de façon que les bactéries à Gram positif étaient plus sensibles au potentiel antimicrobien, cependant les levures étaient résistantes aux concentrations testées (0,1 à 20 mg / ml).





**Figure 19.** Activité antifongique des EFA aux trois stades de maturation : <sup>(a)</sup>*A. niger*, <sup>(b)</sup>*A. flavus*,  
<sup>(c)</sup>*Penicillium.sp.*, <sup>(d)</sup>*Fusarium.sp.*

**Orak et al. (2011)** ont constaté que l'extrait aqueux de feuilles d'*A. unedo* exerce un effet inhibiteur que sur *S. aureus* ( $21,1 \pm 1,40$  mm) à 40  $\mu$ l d'extrait (250 mg / ml). Tandis qu'ils n'ont enregistré aucune activité antimicrobienne vis-à-vis d'*E. coli* et *Salmonella enteritidis*. D'un autre côté, cet extrait a présenté un niveau d'inhibition élevé vis-à-vis deux moisissures aflatoxigènes ; *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 et NRRL 465.

Dans une étude concernant l'activité antimicrobienne des extraits aqueux des racines d'*A. unedo*, une faible activité antibactérienne vis-à-vis de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) (9 mm) a été mise en évidence, néanmoins, une activité antibactérienne modérée a été enregistrée vis-à-vis d'*E. coli* ATCC 25922 (30 mm) et *S. aureus* (ATCC 25923) (12 mm) (**Dib et al., 2013**).

### III. Résultats et Discussion

**Tableau 7.** Diamètres des zones d'inhibition des EFA aux trois stades de maturation vis-à-vis les souches microbiennes testées

Souches microbiennes		Diamètre des zones d'inhibition (mm)		
		EFV	EFJ	EFR
Bactéries Gram -	B1	19,00±1,73 <sup>(a)</sup>	16,00±1,00 <sup>(a)</sup>	18,33±1,52 <sup>(a)</sup>
	B2	15,00±1,52 <sup>(a)</sup>	14,33±1,15 <sup>(a)</sup>	10,33±1,52 <sup>(b)</sup>
	B3	18,00±1,54 <sup>(a)</sup>	15,00±1,00 <sup>(b)</sup>	17,33±0,57 <sup>(ab)</sup>
	B4	16,00±1,00 <sup>(a)</sup>	14,33±1,00 <sup>(a)</sup>	10,66±0,57 <sup>(b)</sup>
	B5	15,33±0,57 <sup>(a)</sup>	14,33±2,08 <sup>(a)</sup>	12,33±1,52 <sup>(a)</sup>
Bactéries Gram +	B6	14,66±0,57 <sup>(a)</sup>	13,00±1,00 <sup>(ab)</sup>	11,66±0,57 <sup>(b)</sup>
	B7	16,66±1,15 <sup>(ab)</sup>	18,66±1,88 <sup>(a)</sup>	12,66±1,33 <sup>(b)</sup>
	B8	17,00±1,00 <sup>(b)</sup>	23,00±1,52 <sup>(a)</sup>	13,66±1,52 <sup>(b)</sup>
Moississures	M1	17,00±0,85 <sup>(b)</sup>	21,00±1,50 <sup>(a)</sup>	15,00±1,00 <sup>(b)</sup>
	M2	18,00±1,15 <sup>(ab)</sup>	17,00±0,75 <sup>(b)</sup>	20,00±0,33 <sup>(a)</sup>
	M3	20,00±1,00 <sup>(b)</sup>	25,00±0,33 <sup>(a)</sup>	26,00±0,52 <sup>(a)</sup>
	M4	21,00±0,51 <sup>(b)</sup>	26,00±0,52 <sup>(a)</sup>	24,00±0,50 <sup>(a)</sup>

<sup>(EFV)</sup> Extrait de fruit vert, <sup>(EFJ)</sup> Extrait de fruit jaune, <sup>(EFR)</sup> Extrait de fruit rouge.  
 B1: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, B2: *Acinetobacter baumannii* ATCC19606, B3: *Escherichia coli* ATCC 25922, B4: *Klebsiella oxytoca* ATCC 25922, B5: *Salmonella sp.*, B6: *Listeria monocytogenes* ATCC 25922, B7: *Bacillus subtilis* ATCC 21332, B8: *Staphylococcus aureus* ATCC25923.  
 M1: *Aspergillus flavus*, M2: *Aspergillus niger*, M3 : *Penicillium*, M4 : *Fusarium*.  
<sup>(a, b)</sup> groupements hétérogènes par test HSD.

L'activité antimicrobienne des fractions phénoliques pourrait être due à la sensibilité de la souche aux tanins, aux flavonoïdes et aux autres composants phénoliques (Djipa et al., 2000; Esquenazi et al., 2002). Ho et al. (2001), ont démontré que les tanins de l'épicatéchine et de la catéchine avaient une forte activité antimicrobienne contre les bactéries et les champignons, ce qui explique nos résultats trouvés avec l'EFV le plus riche en tanins.

L'activité antibactérienne des composés phénoliques est causée par l'interaction avec différents sites cellulaires microbiens, les mécanismes d'action peuvent être compris la modification de la perméabilité de la membrane cellulaire, la formation de granules cytoplasmiques, la rupture de la membrane cytoplasmique et la perturbation des fonctions intracellulaires par la formation de liaisons hydrogène entre composés phénoliques et enzymes provoquant la perte de constituants cellulaires, l'effondrement de la membrane

### III. Résultats et Discussion

cytoplasmique bactérienne et la mort cellulaire (Bouarab Chibane et al., 2019). Ainsi, l'élévation du caractère lipophile des composés phénoliques renforce leur activité antimicrobienne en favorisant leur interaction avec la membrane cellulaire. Cela peut induire des dommages irréversibles de la membrane cytoplasmique et une coagulation du contenu cellulaire pouvant même conduire à l'inhibition d'enzymes intracellulaires (Bouarab Chibane et al., 2019).

Dans le tableau 8 sont récapitulés les résultats de la détermination des CMI et des CMB (CMF dans le cas de l'activité antifongique) ainsi que le rapport CMB/CMI.

**Tableau 8.** CMI, CMB, CMF et le rapport CMB/CMI (CMF/CMI) des EFA aux trois stades de maturation vis-à-vis les souches microbiennes testées

Souches microbiennes	Type d'extrait									
	EFV			EFJ			EFR			
	CMI	CMB	R	CMI	CMB	R	CMI	CMB	R	
Bactéries Gram -	B1	1,51	1,51	1	3,12	3,12	1	1,51	1,51	1
	B2	0,75	0,75	1	0,75	0,75	1	0,75	0,75	1
	B3	1,51	1,51	1	0,75	0,75	1	1,51	1,51	1
	B4	1,51	1,51	1	0,75	0,75	1	1,51	1,51	1
	B5	0,75	0,75	1	0,75	0,75	1	0,75	0,75	1
Bactéries Gram+	B6	0,75	0,75	1	12,5	12,5	1	0,75	0,75	1
	B7	0,75	0,75	1	12,5	12,5	1	0,75	0,75	1
	B8	0,75	0,75	1	12,5	12,5	1	0,75	0,75	1
Moisissures		CMI	CMF	R	CMI	CMF	R	CMI	CMF	R
	M1	1,51	1,51	1	0,75	21,5	28,66	1,51	1,51	1
	M2	0,75	0,75	1	0,75	0,75	1	0,75	0,75	1
	M3	1,51	1,51	1	0,75	0,75	1	1,51	1,51	1
	M4	0,75	3,12	4,16	0,75	0,75	1	0,75	0,75	1

(<sup>EFV</sup>) Extrait de fruit vert, (<sup>EFJ</sup>) Extrait de fruit jaune, (<sup>EFR</sup>) Extrait de fruit rouge. (<sup>CMI</sup>) Concentration minimale inhibitrice (mg/mL), (<sup>CMB</sup>) Concentration minimale bactéricide (mg/mL), (<sup>CMF</sup>) Concentration minimale fongicide (mg/mL), (<sup>R</sup>) rapport CMB/CMI (CMF/CMI), (<sup>BC</sup>) Bactéricide, (<sup>FC</sup>) Fongicide, (<sup>FS</sup>) Fongistatique.

B1: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, B2: *Acinetobacter baumannii* ATCC19606, B3: *Escherichia coli* ATCC 25922, B4: *Klebsiella oxytoca* ATCC 25922, B5: *Salmonella sp*, B6: *Listeria monocytogenes* ATCC 25922, B7: *Bacillus subtilis* ATCC 21332, B8: *Staphylococcus aureus* ATCC25923.

M1: *Aspergillus flavus*, M2: *Aspergillus niger*, M3 : *Penicillium*, M4 : *Fusarium*.

En analysant le tableau 8, il ressort que les CMI des EFV et EFR variées de moins 0,75 mg/ml à 1,51 mg/ml, par contre, ceux de l'EFJ allant de moins 0,75 mg/ml à 12,5 mg/ml pour toutes les souches microbiennes testées.

D'après les résultats trouvés par **Takwa et al. (2018)**, les extraits de fruit mature d'*A. unedo* collecté au Portugal ont démontré une activité particulièrement élevée contre *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter cloacae* traduit par des CMI de l'ordre de 0,15 mg/ml, 0,10 mg/ml, 0,15 mg/ml et 0,20 mg/ml respectivement.

Par ailleurs, **Dib et al. (2013)** ont constaté que l'extrait aqueux et celui méthanolique des racines d'*A.unedo* sont efficaces vis-à-vis d'*E. coli* avec une CMI de 200 et 600 µg / ml respectivement.

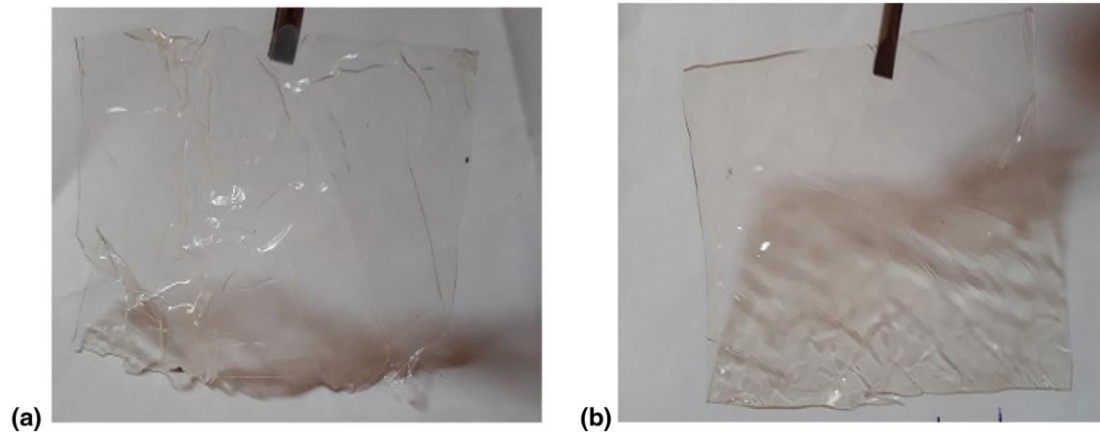
Le rapport CMB / CMI précise la modalité d'action de la substance. Selon **Marmonier (1990)**, lorsque le rapport d'activité CMB / CMI d'une substance antimicrobienne est inférieur ou égal à quatre ( $\leq 4$ ), cette dernière est qualifiée de substance bactéricide et s'il est supérieur à quatre ( $> 4$ ), alors il est dit bactériostatique. En effet, en analysant le tableau 9, nous pouvons conclure que tous les extraits ont un effet bactéricide sur toutes les souches bactériennes testées. Ils ont aussi un effet fongicide à l'exception de EFJ vis-à-vis *A. flavus* et EFV vis-à-vis *Fusarium.sp* où ils exercent un effet fongistatique.

#### III.5. Application du fruit d'*A. unedo* dans la conservation des aliments

##### III.5.1. Caractérisation des films préparés

###### III.5.1.1. Caractéristiques macroscopiques

A l'œil nu, les films à base de la gélatine additionnés ou non de l'EFR (film à tester « FA » et le film témoin « FT » respectivement) présentent une homogénéité et une absence de particules insolubles, de couleur transparente, FA était légèrement jaune en raison de la couleur naturelle d'EFR comme indiqué sur la figure 20. Les deux films sont sans odeur, avec certain flexibilité, présentent un caractère de gonflement lorsque ils sont mise en contact avec de l'eau.



**Figure 20.** Photographie des films préparés : <sup>(a)</sup> FT, <sup>(b)</sup> FA

L'EFR a été utilisé pour la préparation de film en basant sur les résultats de l'étude des activités antioxydantes et antimicrobiennes des EFA aux différents stades de maturation, qui ont montré que cet extrait a présenté la meilleure activité antioxydante mesurée par plusieurs méthodes, comme il a doté d'un fort pouvoir antimicrobien envers les souches testées.

La concentration finale d'EFR dans le FA (1 mg / ml) a été choisie sur la base des résultats de la détermination des CMI (0,75 mg/ml). En d'autres termes, la concentration en EFR a été choisie supérieure à la CMI, de manière à assurer le seuil efficace de l'extrait sur les microorganismes testés ultérieurement; nous avons également essayé de minimiser l'effet des tanins condensés sur les caractéristiques du film de gélatine car sa concentration primaire en EFR était d'environ 12 mg EC/gE.

L'utilisation de glycérol comme plastifiant améliore la plasticité et l'allongement du film de gélatine, facilitant par conséquent, la manipulation et l'emballage des échantillons. Le rapport glycérol / gélatine utilisé a été choisi sur la base des études précédentes réalisées par **Thomazine et al. (2005)** et **Peña-Rodriguez et al. (2014)**. D'autres études suggèrent un rapport de 0,250 g/g de gélatine en présence de concentrations plus élevées de tanins dans le SFF (10% -30%) (**Peña et al., 2010; Ortiz-Zarama et al., 2016**).

Les tanins et le glycérol ont un effet synergique sur l'amélioration des propriétés du film de gélatine telles que la résistance à la traction, l'élasticité, la température et l'enthalpie de dénaturation de la gélatine et la capacité de blocage des UV (**Peña et al., 2010; Tammineni et al., 2014 ; Ortiz-Zarama et al., 2016; Kriechbaum et Bergström, 2020**). Les tanins ont également la capacité de réduire la matière soluble totale et la perméabilité à la vapeur d'eau des films de gélatine et de réduire l'effet négatif du glycérol sur ces propriétés (**Ortiz-Zarama**

et *al.*, 2016). De plus, les tanins condensés sont connus pour abaisser la cristallinité de la gélatine en diminuant les interactions protéine – protéine conduisant à la précipitation de la gélatine (Naczki *et al.*, 2006; Gómez-Estaca *et al.*, 2009; Peña *et al.*, 2010). Pour éviter de tels effets, nous avons maintenu la concentration de tanins condensés au niveau le plus bas possible tout en maintenant la concentration d'EFR supérieure à la CMI des micro-organismes testés.

#### III.5.1.2. Propriétés physico-chimiques

Le tableau 9 montre la différence de la perméabilité à la vapeur d'eau, de l'opacité, de la solubilité dans l'eau et de l'activité antioxydante entre FA et FT.

**Tableau 9.** Caractéristiques physico-chimiques des films préparés

Tests	Type de film	
	FT	FA
Perméabilité à la vapeur d'eau (g.mm/h.cm <sup>2</sup> .Pa)	08,98 x 10 <sup>-9</sup> ± 0,41 x 10 <sup>-9(a)</sup>	05,01 x 10 <sup>-9</sup> ± 0,11 x 10 <sup>-9(b)</sup>
Opacité (mm <sup>-1</sup> )	00,210 ± 0,001 <sup>(a)</sup>	00,220 ± 0,004 <sup>(a)</sup>
Solubilité dans l'eau (%)	57,33 ± 2,92 <sup>(a)</sup>	61,32 ± 2,30 <sup>(a)</sup>
Réduction du radical DPPH (%)	15,00 ± 0,97 <sup>(b)</sup>	29,00 ± 1,03 <sup>(a)</sup>

a, b: groupes hétérogènes par test HSD

##### III.5.1.2. 1. Perméabilité à la vapeur d'eau (PVE)

La perméabilité à la vapeur d'eau (PVE) mesure le mouvement des molécules de vapeur d'eau sur la matrice du film; par conséquent, il affecte la durée de conservation des produits alimentaires (Nor Adilah *et al.*, 2018).

Selon les données du tableau 9, la PVE des films de gélatine diminuait de 8,98 x 10<sup>-9</sup> à 5,01 x 10<sup>-9</sup> (g.mm/h.cm<sup>2</sup>.Pa) lorsque l'EFR était incorporé (p <0,0001). Ceci était probablement dû à la dispersion de molécules d'extrait dans la matrice du film testé, limitant ainsi la pénétration des molécules d'eau à travers le film en supposant que la présence de composés phénoliques constitués de groupes hydrophiles et hydrophobes peut provoquer une réticulation avec les régions hydrophobes des protéines de gélatine (Wu *et al.*, 2013). Par conséquent, la structure en réseau des films est devenue plus dense et moins perméable. La diminution de la PVE peut être donc un paramètre recherché lors de la préparation des films d'emballage pour la

conservation des produits alimentaire sec comme les biscuits et les fruits sec à titre d'exemple.

**Gómez-Guillén et al. (2007)** ont également enregistré une diminution de ce paramètre lors de l'ajout d'extrait de *Murta* aux films de gélatine de poisson.

#### **III.5.1.2.2. Opacité**

L'opacité est un paramètre important pour les matériaux d'emballage alimentaire car elle permet de déterminer le degré d'exposition aux rayons ultraviolets et visibles qui pourraient provoquer la détérioration des aliments et en même temps détermine la capacité des films à agir comme une barrière protectrice pour empêcher l'oxydation des aliments emballés. (**Rubilar et al., 2013**).

FA et FT ont une opacité similaire ( $p > 0,05$ ). L'ajout de l'EFR n'a provoqué aucun changement significatif de la valeur d'opacité du film (tableau 9). Cela peut être attribué à sa concentration (2mg / ml) ajoutée dans le FA qui pourrait être considérée comme faible pour provoquer un changement significatif de l'opacité.

L'opacité est dû au compactage plus élevé de la chaîne polymère qui modifie l'indice de réfraction et restreint le passage de la lumière à travers la matrice du film (**Ortega-Toro et al., 2014**).

**Nor Adilah et al.(2018)** ont constaté que l'opacité d'un film à base de gélatine de poisson incorporé de l'extrait d'écorce de mangue augmentait avec l'augmentation des concentrations d'extrait. En outre, **Gómez-Guillén et al. (2007)** et **Gómez -Estaca et al. (2009)** ont enregistré les valeurs d'opacité les plus élevées pour les films contenant des extraits de plantes; ils expliquent ce résultat par l'enrichissement des films en polyphénols et, dans une certaine mesure, par des interactions polyphénol-protéine.

#### **III.5.1.2.3. Solubilité dans l'eau**

La solubilité de film dans l'eau est de l'ordre de  $57,33 \pm 2,92$  % et  $61,32 \pm 2,30$  % pour FT et FA respectivement. L'ajout d'EFR à la gélatine n'a provoqué aucune variation significative de la solubilité dans l'eau du FA par rapport au témoin ( $p > 0,05$ ) (tableau 9).

Selon **Sifuentes-Nieves et al. (2015)**, la solubilité dans l'eau des films est un facteur important pour déterminer le potentiel de biodégradabilité, car les polymères les plus susceptibles de se dissoudre sont plus faciles à se hydrolyser et deviennent donc des molécules plus petites.

La différence non significative entre la valeur de la solubilité dans l'eau de FT et FA suggère que l'EFR n'a pas interféré avec la disposition des chaînes protéiques dans la matrice de gélatine et, pour cette raison, le film conserve sa caractéristique hydrophile ou en raison de la concentration de l'extrait.

Dans la littérature, il n'y a pas de résultats sur la solubilité dans l'eau des films à base de gélatine incorporés de l'extrait de fruit d'*A. unedo*. Cependant, **Bodini et al. (2013)**, ont rapporté des résultats similaires sur un film à base de gélatine avec un extrait de propolis. **Gómez-Estaca et al. (2009)**, ont également rapporté que l'ajout d'extraits aqueux d'origan et de romarin à la gélatine d'origine bovine ne produisait aucune différence significative dans la solubilité des films.

#### **III.5.1.2.4. Activité antioxydante des films**

La détermination de l'activité antioxydante des films permet de connaître la capacité de ces matières actives à protéger les aliments des processus oxydatifs qui pourraient raccourcir la durée de conservation en entraînant une grave détérioration organoleptique et donc le rejet par le consommateur (**Mellinas et al., 2020**).

Les résultats exprimés en tant que pourcentage de l'activité anti-radicalaire (tableau 9) révèlent que le film avec extrait (FA) démontre une activité anti-radicalaire de l'ordre de 29%, le film sans EFR (FT) a également présenté une certaine activité de piégeage des radicaux libres (15%), qui pourrait être attribuée aux propriétés antioxydantes du peptide de la gélatine (**Roy et Rhim, 2019**).

La capacité de piégeage des radicaux libres des composés phénoliques est principalement due à leurs propriétés redox, qui leur permettent d'agir comme agents réducteurs, donneurs d'hydrogène et désactivateurs d'oxygène singulet (**Siripatrawan et Harte, 2010**). En conséquence, l'incorporation d'EFR a conféré un certain pouvoir antioxydant aux films FA par rapport au FT, ce qui a été attribué à la présence de composés phénoliques dans l'EFR.

Par conséquent, l'utilisation des extraits antioxydants à partir de sources naturelles semble être un moyen plus prometteur pour l'amélioration de la propriété antioxydante des films alimentaire (**Li et al., 2007**).

La capacité antioxydante des films à base de gélatine contenant des extraits bioactifs a été rapportée dans la littérature. Les films à base de gélatine de peau de thon additionnés d'extrait méthanolique d'algues brunes ont montré un pourcentage de piégeage du radical DPPH d'environ 50% (**Haddar et al., 2012**). En outre, pour les films à base de gélatine de peau de



carpe argentée (*H.molitrix*) incorporé d'extrait de thé vert, le pourcentage de piégeage du radical DPPH était de 31,4% (Wu et al., 2013).

#### III.5.1.3. Détection des groupes fonctionnels et des changements structuraux dans les films

L'analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est utilisée pour détecter les groupes fonctionnels et les changements structuraux dans les films de gélatine au niveau moléculaire (Dammak et Sobral, 2019). La figure 21 présente les spectres FTIR de FT et FA.

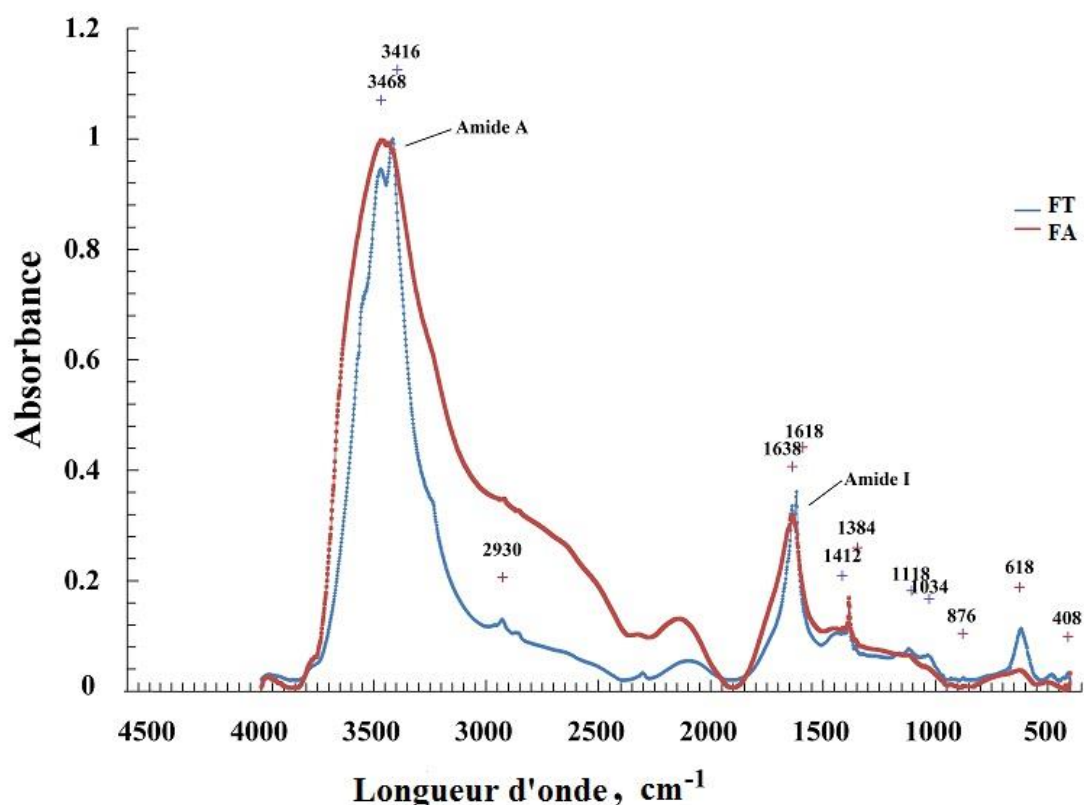


Figure 21. Spectres FTIR de FT et FA.

Il est connu que les régions spécifiques du spectre FTIR représentant les bandes protéiques caractéristiques constituées de l'amide A ( $3600-3100\text{ cm}^{-1}$ ) dérivent principalement de l'étirement N-H, et l'amide I ( $1750-1600\text{ cm}^{-1}$ ) provenait principalement de l'étirement C = O (Barth, 2007).

La figure 21 montre que la largeur de bande des régions amide A et I qui sont apparues à  $3416-1618\text{ cm}^{-1}$  et  $3468-1638\text{ cm}^{-1}$  pour FT et FA respectivement, s'est élargie dans le spectre correspondant au film testé (FA) en raison de l'ajout d'EFR et plus précisément à la présence de composés phénoliques.

Dans la littérature, l'élargissement des bandes amide A et I dans les régions indiquées est dû à la formation de liaisons hydrogènes entre les protéines et les composés phénoliques (**Alkan et al., 2011**). **He et al. (2011)** ont également signalé que l'élargissement de la bande amide A et amide I du spectre du film de collagène contenant des procyanidines suggérait la formation d'une liaison hydrogène entre le collagène et les composés phénoliques.

En outre, l'absorption dans la région amide I est la plus utile pour l'analyse spectroscopique infrarouge de la structure secondaire des protéines. **Yakimes et al. (2005)** ont rapporté que le pic d'absorption à  $1633\text{ cm}^{-1}$  était la caractéristique de la structure en spirale de la gélatine. Le déplacement de la bande amide I du  $1618\text{ cm}^{-1}$  dans FT à  $1638\text{ cm}^{-1}$  dans le FA a suggéré que l'EFR pourrait affecter la structure hélicoïdale de la gélatine.

**Zhao et al. (2016)**, ont prouvé l'effet de l'utilisation d'extrait naturel sur la modification de la structure de la gélatine en jouant le rôle d'un agent de réticulation, ce qui conduit à la formation de liaisons hydrogène entre l'eau et les groupes hydroxyles libres d'acides aminés ou de composés phénoliques. Les résultats ont indiqué que l'intégration de cet extrait dans la gélatine améliorerait considérablement la résistance du gel par rapport à la gélatine non traitée.

#### **III.5.2. Effet du film sur l'hydrolyse et l'oxydation du beurre**

Le beurre est le produit de matière grasse laitière le plus apprécié et le plus fabriqué. Il contient au moins 80% de matières grasses et au maximum 16% d'eau. Il est souvent stocké pendant de longues périodes. Le principal problème affectant le beurre pendant le stockage est la rancidification causée par la lipolyse et l'oxydation des acides gras ce qui altère la saveur et abaisse la qualité nutritionnelle du beurre, créant ainsi de sérieux problèmes et des pertes économiques dans les industries laitière et de distribution alimentaire (**Méndez-Cid et al., 2017**).

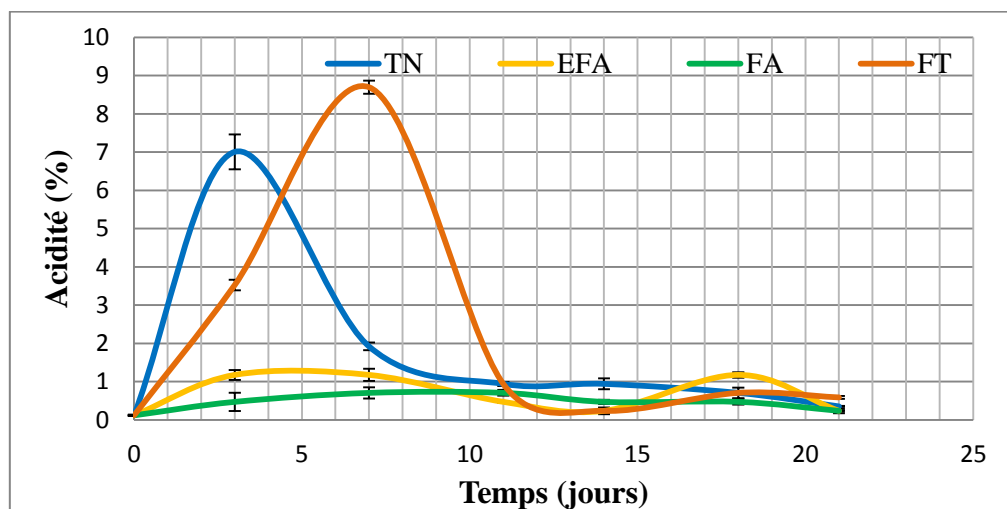
Par ailleurs, l'emballage antioxydant est une alternative très prometteuse pour prolonger la durée de conservation des produits alimentaires. L'enrichissement des films en antioxydants permet d'améliorer les aspects de qualité nutritionnelle et esthétique sans affecter l'intégrité du produit alimentaire (**Valdés García et al., 2020**).

L'évolution des paramètres indiquant les changements dans la stabilité à l'oxydation pendant le stockage des échantillons de beurre étalés par EFR ou emballés par FA comparativement aux témoins (TN et FT), sont illustrés par les figures de **22** à **25**.

#### III.5.2.1. Acidité du beurre

En analysant la figure 22, il est nettement claire que ce paramètre augmente de manière hautement significative ( $p < 0,001$ ) pendant les premiers jours du stockage au froid pour les échantillons témoins TN et FT, atteignant des valeurs comprises entre 63 et 79 fois plus élevées au 3<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jours de stockage respectivement par rapport au premier jour (0,11 %). Cependant, les échantillons de beurre emballés dans le FA et ceux étalés par l'EFR ont connu une légère augmentation de l'acidité en comparant cette dernière au début et à la fin de la période du stockage ( $p > 0,05$ ) cela peut être s'expliqué par l'effet de l'extrait de fruit et de son incorporation dans un polymère à protéger le beurre contre la lipolyse.

Les études précédentes sur la stabilité de la matière grasse du beurre impliquent des essais accélérés réalisés à des températures élevées, et aucune information n'est disponible concernant les changements de produits lors du stockage réfrigéré à l'exception de l'étude réalisée par Méndez-Cid et al. (2017) sur l'effet du sel et de la température sur la conservation du beurre de lait de vache pendant 9 mois de stockage où les valeurs de l'acidité obtenues à la fin de la conservation sont de l'ordre de 0,95 à 1,09% d'acide oléique.



**Figure 22.** Evolution de l'acidité du beurre au cours du stockage réfrigéré : <sup>(TN)</sup> témoin négatif, <sup>(EFR)</sup> extrait de fruit rouge, <sup>(FA)</sup> film à tester, <sup>(FT)</sup> film témoin

L'augmentation de l'acidité lors du stockage du beurre pourrait s'expliquer par l'hydrolyse des triglycérides qui se produit lors du stockage; probablement une hydrolyse enzymatique puisque l'hydrolyse chimique ne serait possible que dans les lipides à forte teneur en humidité ( $> 20\%$ ) ou lorsque la graisse est utilisée à des températures élevées (180–220 °C) (Hultin, 1992).

De plus, la présence de levures et de moisissures sur l'échantillon emballé peut être cohérent avec l'hydrolyse enzymatique puisque certains de ces micro-organismes pourraient avoir la capacité de sécréter la lipase, responsable de l'hydrolyse enzymatique dans le lipide (Hultin, 1992).

#### III.5.2.2. Teneur en peroxyde

La teneur en peroxyde (PV) reste la méthode chimique la plus courante pour surveiller la détérioration oxydative des lipides. Une valeur élevée peut refléter une formation accrue d'hydroperoxydes ou une décomposition réduite (Gordon, 2004).

En analysant la figure 23, il est clair que la PV initiale ( $0,17 \pm 0,1 \text{ meq O}_2/\text{Kg}$ ) de tous les échantillons augmente de manière classique et hautement significative ( $P < 0,001$ ) pendant la période de stockage de 21 jours à la température de réfrigération, mais avec des amplitudes variables.

De nombreux facteurs affectent la stabilité à l'oxydation des produits laitiers, comme la concentration d'oxygène, d'antioxydants, de métaux ( $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ) et l'activité de l'eau (O'Connor et O'Brien, 2006). Pour cette raison, il est difficile de commenter la PV. La chose la plus claire est que la PV était hautement significativement affectée ( $P < 0,001$ ) par l'utilisation de l'extrait de fruit quel que soit seul (EFR) ou incorporé dans la gélatine (FA), en effet, la formation du peroxyde a été retardée par rapport au témoin ( $P < 0,01$ ). C'était une indication de l'activité de piégeage des radicaux libres par les substances actives contenant dans l'EFR.

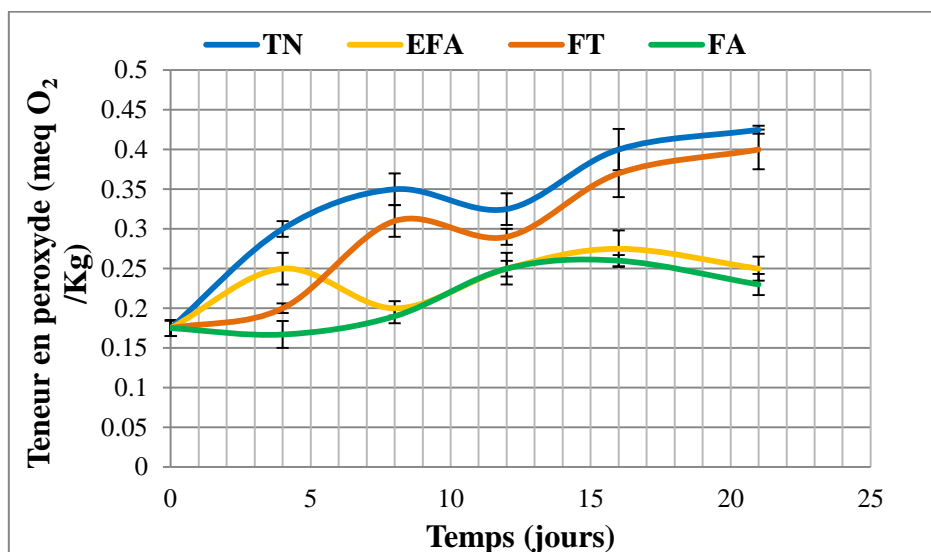


Figure 23. Evolution de la PV du beurre au cours du stockage réfrigéré: <sup>(TN)</sup> témoin négatif,

<sup>(EFR)</sup> extrait de fruit rouge, <sup>(FA)</sup> film à tester, <sup>(FT)</sup> film témoin

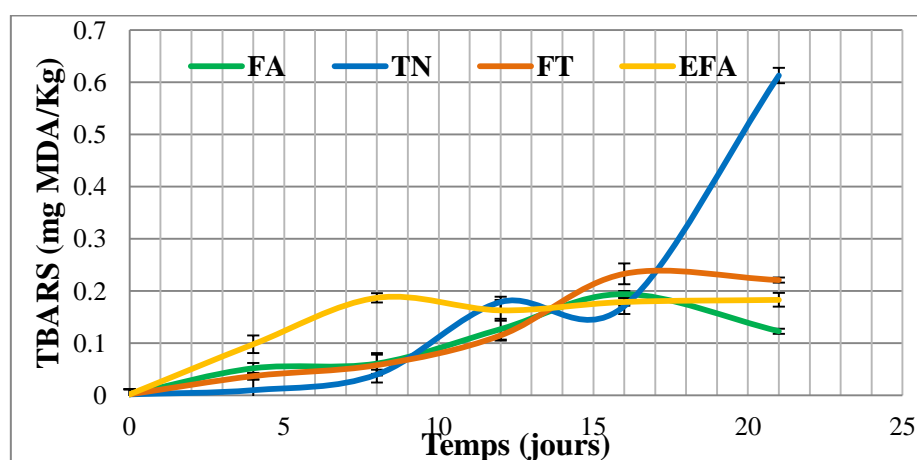
Lorsque la concentration de peroxyde atteint un certain niveau, des changements complexes se produisent avec la formation de cétones, d'aldéhydes et de groupes hydroxyles qui sont volatils et principalement responsables des arômes (rancissement) et des odeurs (**Choe et Min, 2006**). Cependant, les antioxydants prolongent la période d'induction de l'oxydation ou ralentissent sa vitesse. Ils éliminent les radicaux libres tels que les radicaux alkyles lipidiques ou les radicaux peroxy lipidiques, contrôlent les métaux de transition, éteignent l'oxygène singulet et inactivent les sensibilisateurs (**Choe et Min, 2006**).

À ce jour, il n'y a pas de travaux sur la conservation du beurre par un emballage incorporé des substances actives d'origine naturelle ou des extraits de plantes. Cependant, il existe certaines études sur l'application directe des antioxydants naturels. En effet, l'étude d'**Abid et al. (2017)** sur la stabilité au stockage du beurre traditionnel Tunisien enrichi en antioxydants provenant des sous-produits de transformation de la tomate a révélé que ces antioxydants ont considérablement inhibé la formation de peroxyde.

#### III.5.2.3. Indice TBARS

Le test TBARS mesure les produits secondaires de l'oxydation des lipides (**O'Connor et O'Brien, 2006**). Puisque des hydroperoxydes sont formés dans les échantillons de beurre pendant 21 jours du stockage (figure 23), ce test a été appliqué (figure 24).

L'indice de TBARS dans la présente étude a augmenté de manière significative ( $p < 0,05$ ) pendant la période du stockage. Néanmoins, cette augmentation diffère d'un groupe d'échantillon à l'autre ( $p < 0,001$ ), en effet, les échantillons TN présentent le plus grand indice ( $0,61 \pm 0,01$  mg MDA/Kg) à la fin de la conservation comparativement aux autres échantillons FT ( $0,22 \pm 0,03$  mg MDA/Kg), EFR ( $0,18 \pm 0,03$  mg MDA/Kg) et FA ( $0,12 \pm 0,07$  mg MDA/Kg).



**Figure 24.** Evolution de l'indice TBARS du beurre au cours du stockage réfrigéré : <sup>(TN)</sup> témoin négatif, <sup>(EFR)</sup> extrait de fruit rouge, <sup>(FA)</sup> film à tester, <sup>(FT)</sup> film témoin

### **III. Résultats et Discussion**

---

L'indice initial ( $2, 10^{-3}$  mg de MDA / kg) est légèrement inférieur à ceux rapportés pour le beurre frais dans des études menées par **Özkanli et Kaya (2007)**. Dans la présente étude, l'utilisation de l'extrait de fruit a eu un effet significatif ( $p < 0,001$ ) sur les valeurs de TBARS, et il a diminué la formation de malondialdéhyde, cet effet a été amélioré avec l'incorporation de l'extrait (EFR) dans la gélatine (FA).

Le film FT a démontré aussi une activité remarquable sur l'atténuation du processus de l'oxydation secondaire, cet effet peut être expliqué par les bonnes propriétés de barrière à l'oxygène de la gélatine et qui sont données par les liaisons hydrogène présentes dans le polymère et par la présence des peptides et des acides aminés qui peuvent agir comme donneurs d'électrons et exercent une activité antioxydante (**Gallego et al., 2020**).

**Armenteros et al. (2013)** ont combiné l'extrait de fruits d'*Arbutus* avec l'ascorbate de sodium et le nitrite de sodium afin d'améliorer la stabilité à l'oxydation des saucisses de Francfort sans modifier leurs propriétés de couleur et de texture. L'utilisation de ces extraits a également minimisé la détérioration de la qualité pendant le stockage réfrigéré.

En outre, des études menées par **Ganhão et al. (2010)** et **Ganhão et al. (2013)** ont montré que l'ajout d'extraits de fruits d'*A. unedo* dans les hamburgers à base de viande porcine a protégé les acides gras polyinsaturés de la dégradation oxydative et a inhibé la formation de substances réactives à l'acide thiobarbiturique et de composés volatils, de plus, il a protégé contre l'oxydation des protéines en empêchant la formation de composés carbonylés. Il a amélioré aussi les propriétés nutritionnelles et sensorielles de ces hamburgers.

Par ailleurs, lors d'une étude réalisée par **Gallego et al. (2020)**, un emballage à base de la gélatine enrichi par les antioxydants de sous-produits de la tomate a démontré son efficacité à prévenir l'oxydation des lipides de la viande du porc en diminuant la valeur de TBARS des échantillons comparativement au témoin à la fin de la conservation.

À cet égard, on peut conclure que l'utilisation du film à base de gélatine incorporé d'EFR minimise les processus d'oxydation qui se produisent pendant le stockage de la graisse du beurre. Cela semble être dû à l'effet exponentiel et combiné des substances bioactives et antioxydantes présentes dans l'extrait de fruit d'une part et de l'effet antioxydant de la gélatine d'autre part.

On peut retenir que l'activité antioxydante de l'extrait de fruit d'*A.unedo* pourrait contrecarrer l'oxydation des lipides en protégeant les lipides cibles des initiateurs d'oxydation ou en

retardant la phase de propagation, ce qui pourrait être obtenu grâce aux différents mécanismes tels que l'élimination des radicaux libres, l'inactivation des peroxydes, des produits secondaires d'oxydation lipidique et d'autres espèces réactives de l'oxygène et la chélation des métaux (Laguerre et al., 2007).

#### III.5.3. Effet antibactérien du film et conservation de la sardine

##### III.5.3.1. Analyse de la matière première

Le pH initial et la charge microbienne initiale des filets de la sardine (FTAM, coliformes, *Salmonella* et levures et moisissures) ont été évalués. La recherche et le dénombrement de bactéries utilisées plus tard dans le processus de conservation (*S. aureus*, *L. monocytogenes* et *P. aeruginosa*) ont également été réalisés. Les résultats sont illustrés dans le tableau 10.

Comme il est indiqué dans le tableau 10, le pH initial des filets de sardine est de  $6,31 \pm 0,5$ . Le pH entre 6,2 et 6,8 reflète une bonne qualité de poisson (Matche et al., 2020).

**Tableau 10.** pH initial et charges microbiennes initiale (UFC/g) de la sardine testée

pH	6,31±0,5
FTAM	11,81x10 <sup>3</sup>
Coliformes	00
<i>Salmonella</i>	Absence
<i>S. aureus</i>	00
<i>L.monocytogenes</i>	Absence
<i>P. aeruginosa</i>	00
Levures et moisissures	00

En ce qui concerne la charge bactérienne des échantillons, l'absence totale de tous les germes recherchés à l'exception de la FTAM dont le nombre est de l'ordre de  $11,81 \times 10^3$  UFC/g a été enregistrée, ce nombre initial de bactéries aérobies mésophiles indique une qualité de poisson acceptable, compte tenu de la limite supérieure proposée pour le comptage sur plaque aérobie de  $5,10^5$  UFC/g ( $5,70 \log$  UFC/g) pour le poisson frais (ICMSF, 1986).

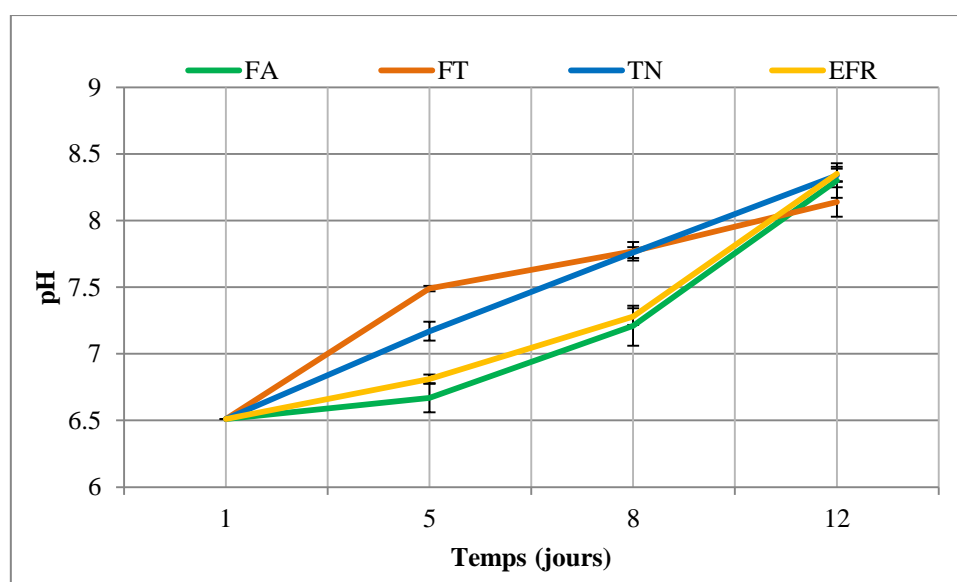
Il est généralement admis que le tissu musculaire des poissons vivants sains est stérile, bien que quelques rapports indiquent le contraire. La flore bactérienne naturelle réside principalement dans la couche visqueuse externe de la peau, sur les branchies et dans le tractus gastro-intestinal. La charge microbienne totale est sujette à des variations saisonnières

et dépend de la pollution et de la température de l'environnement, de la méthode de capture et des conditions de manutention à bord des navires de pêche (Lougois et Kyrana, 2005).

#### III.5.3.3. Évaluation du pH de la sardine pendant le stockage

Le pH initial de la sardine fraîche était de  $6,31 \pm 0,5$ , cette valeur a progressivement augmenté au cours de la période de stockage frigorifique pour tous les échantillons, mais cette augmentation varie en fonction du groupe des échantillons étudiés et de la nature de la souche bactérienne testée. Des résultats similaires ont été rapportés chez la dorade traitée à l'huile essentielle de thym (Goulas et Kontominas, 2007).

Les résultats obtenus pour la sardineensemencée volontairement par *S. aureus*, *L. monocytogenes* et *P. aeruginosa* sont représentés dans les figure 25, 26 et 27 respectivement.



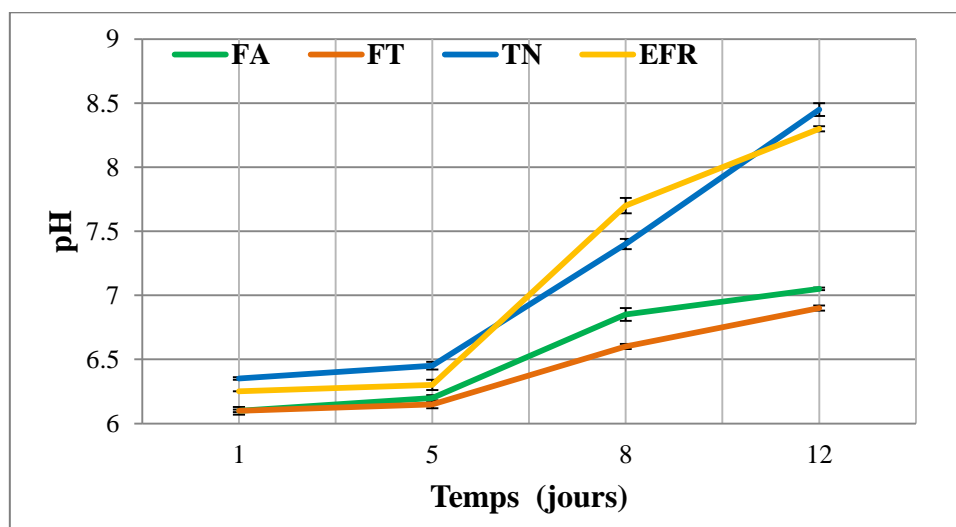
**Figure 25.** Evolution du pH des sardines inoculées par *S. aureus* pendant la conservation : <sup>(TN)</sup> témoin négatif, <sup>(EFR)</sup> extrait de fruit rouge, <sup>(FA)</sup> film à tester, <sup>(FT)</sup> film témoin

En analysant la figure 25 (sardine inoculée avec *S. aureus*), nous constatons que l'augmentation des valeurs de pH des échantillons couverts par EFR et ceux enveloppés par FA a été moins importante pendant les huit (8) premiers jours par rapport aux deux autres échantillons constituant les témoins ( $p < 0,001$ ) de façon que l'effet de FA sur l'augmentation du pH est plus remarquable que celui d'EFR seul ( $p < 0,001$ ). Tandis qu'il n'y a pas de différence significative entre tous les échantillons en fin de conservation.

Il semble que l'activité de FA atteint ces limites autour du 8<sup>ème</sup> jour, ce qui peut être expliqué par la libération de la quasi-totalité des molécules actifs de l'extrait de fruit. En effet, des

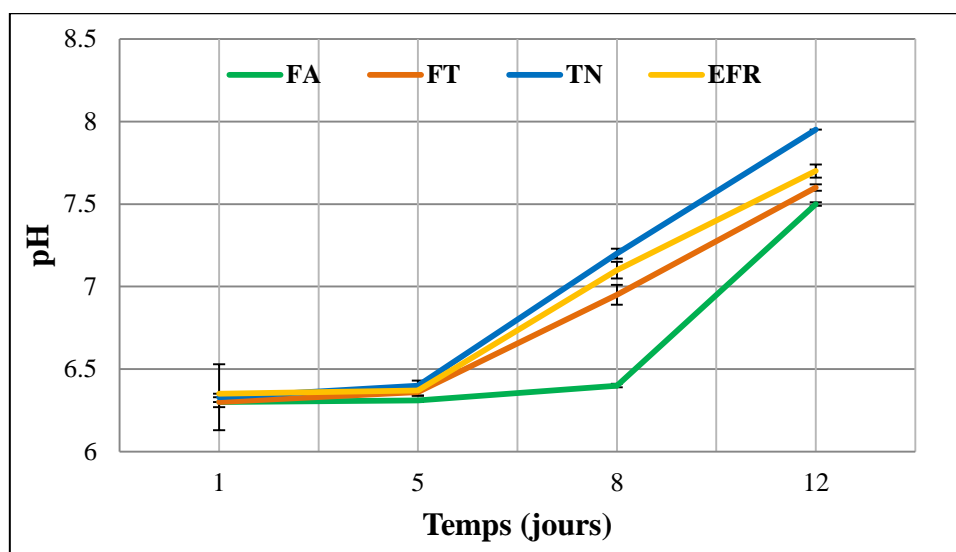


études ont montré qu'un agent actif incorporé dans des films ou des polymères de revêtements pouvait perdre son efficacité, surtout si les groupes fonctionnels responsables de son activité interagissent négativement avec le polymère (Vásconez et al., 2009).



**Figure 26.** Evolution du pH des sardines inoculées par *L. monocytogenes* pendant la conservation : <sup>(TN)</sup> témoin négative, <sup>(EFR)</sup> extrait de fruit rouge, <sup>(FA)</sup> film à tester, <sup>(FT)</sup> film témoin

Cependant, pour la sardine inoculée avec *L. monocytogenes* (figure 26), les échantillons enveloppés par les deux types de film ont des valeurs de pH de l'ordre de 7,05 et 6,9 pour FA et FT respectivement, bien plus faibles en fin de stockage que celles des échantillons TN (pH  $8,45 \pm 0,02$ ) et recouverts par EFR (pH  $8,3 \pm 0,05$ ) ( $p < 0,001$ ).



**Figure 27.** Evolution du pH des sardines inoculées par *P. aeruginosa* pendant la conservation : <sup>(TN)</sup> témoin négative, <sup>(EFR)</sup> extrait de fruit rouge, <sup>(FA)</sup> film à tester, <sup>(FT)</sup> film témoin

De plus, et comme le montre la figure 27, les valeurs du pH des échantillons inoculés avec *P. aeruginosa*, restent stables pendant les cinq (5) premiers jours de stockage à 4 °C pour tous les échantillons. Par la suite, elles augmentent progressivement pour tous les échantillons sauf ceux enveloppés dans le FA, qui ont légèrement augmenté entre le cinquième (pH 6,31± 0,1) et le huitième jour (pH 6,40 ± 0,07).

L'augmentation du pH peut être associée, selon **López-Caballero et al. (2007)**, à la production de molécules basiques telles que l'ammoniac, les alcalis volatils et la triméthylamine qui sont les produits de l'activité enzymatique interne et de la croissance des bactéries. Dans ce contexte, l'effet de FA sur l'évolution du pH des échantillons peut être attribué à l'action combinée de la gélatine et de l'EFR freinant la production de ces substances.

#### III.5.3.4. Activité antibactérienne du film

Le poisson est l'un des produits alimentaires les plus périssables: sa détérioration se produit principalement en raison de la croissance microbienne et de l'activité métabolique, générant des composés indésirables ou inacceptables tels que les sulfures, les alcools, les aldéhydes, les cétones, les amines et les acides organiques (**Yazgan et al., 2019**). Par conséquent, le contrôle microbiologique des bactéries influence positivement la qualité et la durée de conservation du poisson frais; néanmoins, cet aspect est un problème majeur pour l'industrie de la transformation du poisson. Récemment, les chercheurs se sont concentrés sur l'utilisation d'additifs antimicrobiens naturels aux poissons pour réduire sa détérioration microbienne (**Ozogul et al., 2017; Yazgan et al., 2019**).

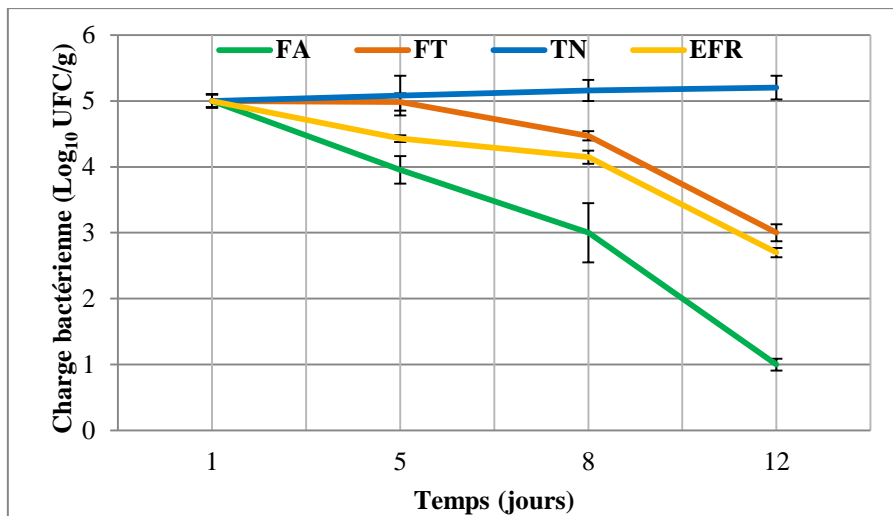
L'effet antibactérien du film FA et de l'EFR en comparaison avec FT et TN vis-à-vis des trois bactéries utilisées mise en test est illustré dans les figures 28, 29 et 30.

Les échantillons de la sardine ont été inoculé volontairement par 10<sup>5</sup> UFC/g de trois souches bactériennes (*S. aureus*, *L. monocytogenes* et *P. aeruginosa*); cette concentration a progressivement diminué au cours de 12 jours de stockage des échantillons en contact direct ou indirect avec EFR. Tous les échantillons TN ont montré une augmentation du nombre de bactéries avec toutes les souches testées.

À la fin du stockage, le nombre initial de *S. aureus* (Figure 28) était significativement réduit (p <0,01) de 5 à environ 1 log UFC/g dans les échantillons emballés par le FA et à 2,5 log UFC/g dans les échantillons étalé par l'EFR. En revanche, le nombre de cette bactérie dans

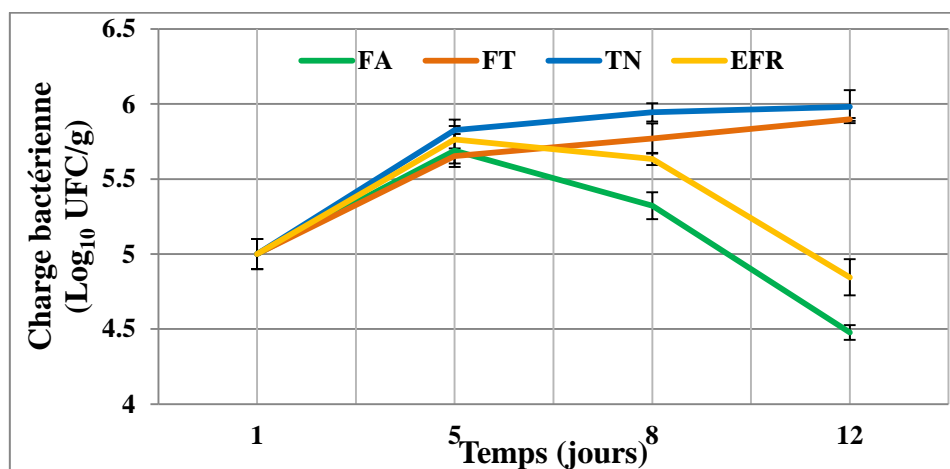
### III. Résultats et Discussion

les échantillons TN a augmenté progressivement pendant le stockage et était significativement plus élevé que les échantillons FA, FT et EFR ( $p < 0,05$ ) depuis le jour 8.

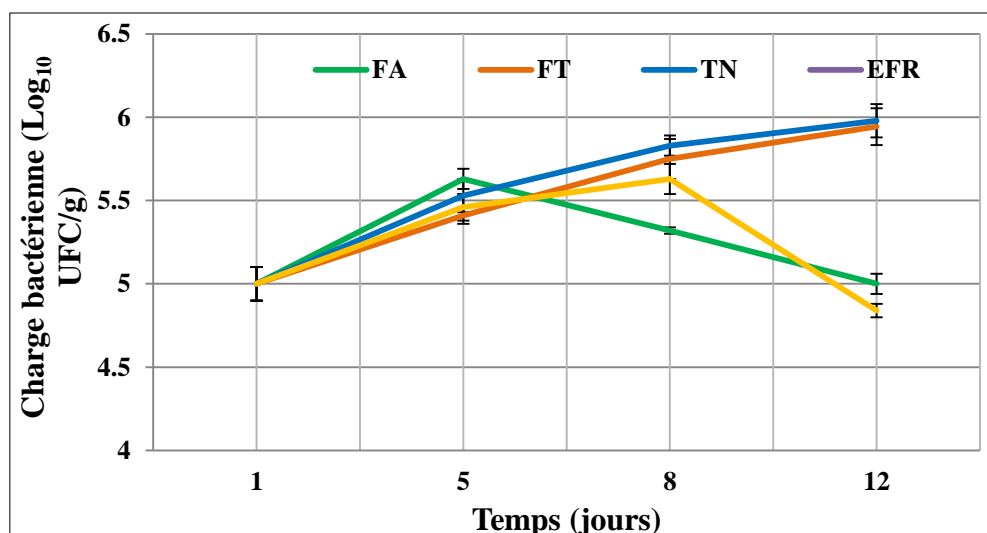


**Figure 28.** Evolution du nombre de *S. aureus* pendant la conservation: <sup>(TN)</sup> témoin négative, <sup>(EFR)</sup> extrait de fruit rouge, <sup>(FA)</sup> film à tester, <sup>(FT)</sup> film témoin

Comme le montre la figure 29 et 30, le dénombrement de *P. aeruginosa* et *L. monocytogenes* a montré une augmentation jusqu'au 5<sup>ème</sup> jour dans tous les échantillons ( $p < 0,05$ ). Après ce jour, leur nombre a progressivement diminué jusqu'à la fin de l'essai (jour 12) uniquement dans les échantillons contenant de l'EFR, où le nombre de *L. monocytogenes* a diminué par 0,7 et 0,3 log UFC/g pour FA et EFR respectivement. Le dénombrement de *P. aeruginosa* sur des filets de la sardine emballés par le FA a montré que cette bactérie retrouve son nombre initial ( $10^5$  UFC / g) au jour 12.



**Figure 29.** Evolution du nombre de *L. monocytogenes* pendant la conservation: <sup>(TN)</sup> témoin négative, <sup>(EFR)</sup> extrait de fruit rouge, <sup>(FA)</sup> film à tester, <sup>(FT)</sup> film témoin



**Figure 30.** Evolution du nombre de *P. aeruginosa* pendant la conservation : <sup>(TN)</sup> témoin négative, <sup>(EFR)</sup> extrait de fruit rouge, <sup>(FA)</sup> film à tester, <sup>(FT)</sup> film témoin

L'activité antibactérienne de l'extrait de fruit d'*A. unedo* contre *P. aeruginosa* et *S. aureus* a été déterminée dans une étude précédente réalisée par **Ben salem et al. (2018)**. Le composé phénolique le plus abondant dans l'EFR est la procyanidine B2 (tableau 6). Les procyanidines exercent un très fort effet inhibiteur et bactéricide sur *S. aureus* en détruisant l'intégrité et la perméabilité de la paroi et de la membrane cellulaire, affectant ainsi la synthèse des protéines et la liaison à l'ADN (**Li et al., 2017**).

Un autre composé important de l'EFR, l'acide gallique, est connu pour sa toxicité relative envers les micro-organismes: en particulier, il a une puissante activité antibactérienne, la cible principale étant la membrane cellulaire bactérienne qui conduit à des changements irréversibles de la perméabilité, la rupture et de la formation de pores (**Borges et al., 2013**). En outre, **Luís et al. (2014)** ont noté que l'acide gallique était le composé le plus actif contre *S. aureus* ATCC 25923, et était capable d'influencer les propriétés d'adhésion cellulaire et d'inhiber l'oxydation de la proline, entraînant une perturbation du métabolisme énergétique critique. De plus, les mêmes auteurs ont proposé que le mécanisme d'action de l'acide caféique (également présent dans l'EFR) soit associé à des dommages à la membrane cellulaire et à des modifications du métabolisme aérobie des cellules de *S. aureus*.

En outre, les flavonols, y compris la rutine, la myricétine et la quercétine-3-glucoside (présents dans l'EFR), exercent une activité antimicrobienne, en raison de leur capacité à se lier à la bicouche lipidique de la membrane. Ils se sont également avérés stimuler la formation

d'agrégats et l'agglutination de la paroi cellulaire staphylococcique (**Kajiya et al., 2002; Shah et al., 2008**).

En plus, la réduction du nombre de *S. aureus* de 2 log au jour 12 pour les échantillons enveloppés dans le FT peut être expliquée par le fait que ce dernier peut créer un microenvironnement non favorable à la croissance de cette espèce bactérienne comparativement au TN qui n'a subi aucun traitement.

Dans le présent contexte, la réduction significative du nombre de *S. aureus* peut être attribuée à l'action combinée de l'EFR riche en flavonoïdes et en acides phénoliques dotés d'une forte activité antimicrobienne, ainsi qu'au micro-environnement créé par le film de la gélatine à basse température. **Umaraw et al. (2020)** ont rapporté que les films contenant des molécules actives telles que les extraits de plantes sont riches en composés phénoliques qui ont tendance à retarder positivement la prolifération microbienne dans les produits carnés. De plus, l'utilisation de films et de revêtements comme vecteurs de molécules bioactives peut garantir leur efficacité sur le site d'action (**Chibane et al., 2018**).

Les effets antibactériens limités du FA et de l'EFR mis en évidence au cours des cinq premiers jours de stockage contre *P. aeruginosa* et *L. monocytogenes* pourraient être attribués à la nature psychrotrophe de ces deux bactéries, qui pourrait avoir une activité antimicrobienne limitée de l'EFR (**Ravishankar et al., 2009**). **Lougovois et Kyrana (2005)** ont cité aussi que les bactéries psychrotrophes à Gram négatif prennent une position dominante dans la microflore de contamination car elles sont bien adaptées aux températures de réfrigération et utilisent efficacement les extraits de chair de poisson.

Néanmoins, l'EFR (riche en acide gallique, en procyanidine B2 et en flavonols) a montré une activité antimicrobienne remarquable in vitro (tableau 7 et 8). **Sorrentino et al. (2018)** ont rapporté une bonne activité antimicrobienne in vitro de l'acide gallique contre *Pseudomonas* spp. **Zhao et al. (2015)** ont également démontré que l'acide gallique causait des dommages irréversibles aux membranes cellulaires en altérant l'hydrophobicité et provoquant la rupture locale ou la formation de pores, entraînant une fuite de constituants intracellulaires.

De plus, cet acide a non seulement réduit la contamination microbienne due à *Pseudomonas* spp., mais a également exercé une action bactériostatique / bactéricide contre d'autres micro-organismes indésirables (**Sorrentino et al., 2018**).

### ***III. Résultats et Discussion***

---

Dans une étude plus récente, il a été rapporté que les acides gallique et férulique modifient de manière irréversible les propriétés des membranes bactériennes. Par exemple, l'acide gallique inhibe principalement la croissance de *L. monocytogenes* grâce à sa capacité à diminuer le pH extracellulaire (**Pernin et al., 2019**).

Plusieurs études sont portées sur l'utilisation des extraits de plantes dans la conservation des produits de la mère, en effet, le résultat trouvé par **Erkan et al. (2010)** ont indiqué que le traitement avec 1% d'huile essentielle de thym et de laurier était efficace pour inhiber la croissance des bactéries d'altération et prolonger la durée de conservation en glace du poisson bleu *Pomatomus saltatrix*. De plus, **Fan et al. (2008)** ont démontré que la charge des bactéries aérobies mésophiles des échantillons des poissons traités par les extraits de thé a été inférieure à ceux des échantillons non traités pendant le stockage au froid.

A notre avis, l'effet antibactérien de l'EFR sur les microorganismes testés peut être le résultat de l'effet synergique exercé par tous les composants présents. L'incorporation d'EFR dans la gélatine est particulièrement intéressante, non seulement en raison de la possibilité de maintenir son effet antimicrobien contre les pathogènes d'origine alimentaire, mais aussi d'éviter le contact direct entre l'EFR et la sardine. En effet, selon **Lv et al. (2011)**, l'utilisation de conservateurs naturels, à des concentrations élevées peut altérer le goût et l'arôme des aliments, affectant l'acceptation du consommateur.

## **Conclusion et perspectives**

Notre présente thèse s'est articulée, d'une part sur la caractérisation physicochimique des fruits d'*A. unedo*, et l'évaluation des activités antioxydante et antimicrobienne de ses extraits méthanoliques aux différents stades de maturation (vert, jaune, rouge) et d'autre part sur l'exploitation de ces activités dans la bioconservation des aliments.

En premier temps, les résultats obtenus ont montré que le fruit d'*A.unedo* pourrait être une alternative saine aux plusieurs types de fruits notamment en hiver, grâce à leur haute teneur en fibres, qui peut être mise en évidence comme une allégation nutritionnelle pour ce fruit. Ils sont également une source d'eau, de protéines et de vitamine C, la quantité de sucres solubles fournis par les fruits rouges est une source modérée d'énergie rapidement disponible.

La composition phénolique est fortement affectées par le stade de maturation dont les fruits rouges sont riches en phénols totaux (72,93 mg EAG /g E) et en flavonoïdes (29,12 mg EQ/ g E). À la fin de la période de maturation, l'EFR présente les plus faibles EC 50 (0,06 mg/ml, 0,07 mg/ml, 0,052 mg/ml, 0,23 mg/ml pour CAT, FRAP, piégeage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et piégeage de l'ABTS respectivement) et par conséquent les meilleures activités antioxydantes mesurées par les différentes méthodes à l'exception de celle de piégeage du radical libre DPPH.

La composition phénolique du fruit rouge a été déterminée par HPLC-DAD qui a révélé une abondance des flavonoïdes et des acides phénoliques dont la procyanidine B2 et l'acide gallique étaient les composés les plus abondants.

La richesse du fruit en différents composés phénoliques lui a conféré une activité antimicrobienne remarquable vis-à-vis des souches bactérienne et fongique testées. Tous les extraits ont un effet bactéricide. Ils ont aussi un effet fongicide à l'exception de l'EFJ vis-à-vis d'*Aspergillus flavus* et EFV vis-à-vis *Fusarium.sp* où ils ont exercé un effet fongistatique.

Toutes ces approches ont pour objectif principal de contribuer à une meilleure connaissance de ces fruits sauvages pour augmenter leur utilisation dans l'alimentation humaine en raison de leurs propriétés bénéfiques pour la santé et de contribuer aussi à leur valorisation et exploitation en technologie agro-alimentaire.

Dans une deuxième partie, l'EFR, et en raison de sa richesse en composés phénoliques et son activité antioxydante élevée et pour son pouvoir antimicrobien intéressant, a été choisi pour la préparation d'un film d'emballage actif à base de la gélatine. Ce film était de couleur transparente légèrement jaune, présentant une homogénéité et une absence de particules insolubles.



L'incorporation de l'EFR dans l'emballage a contribué à la diminution de la perméabilité à la vapeur d'eau et à l'amélioration de son activité antioxydante. Cependant, il n'exerce aucun effet significatif sur l'opacité et la solubilité dans l'eau de film préparé. L'analyse par FTIR a démontré aussi que l'ajout de l'extrait de fruit pourrait affecter la structure hélicoïdale de la gélatine et améliorer la structure de gel par la formation des liaisons entre les composés actifs de l'extrait et la matrice des protéines du gel.

L'efficacité de ce film d'emballage à conserver les produits alimentaires a été testée par la suite sur deux produits; le beurre traditionnel et la sardine (*Sardina pilchardus*).

Le film incorporé d'extrait de fruit (FA) a démontré sa capacité à protéger le beurre, pendant toute la période de stockage à froid, contre la lipolyse (légère augmentation de l'acidité) et à retarder l'oxydation de la matière lipidique (diminuer la formation de peroxyde et de produits secondaires) comparativement au film exempt d'extrait (FT) et à l'extrait seul (EFR).

En ce qui concerne la conservation de la sardine, l'incorporation de l'EFR dans le film de la gélatine a augmenté la durée de conservation des sardines en exerçant un effet antibactérien remarquable contre les souches testées (réduction jusqu'à  $1 \log_{10}$  UFC/g pour *S. aureus*), inocuées intentionnellement sur les filets de la sardine. Cette étude a démontré que l'application de film à base de la gélatine incorporé de l'EFR sur la surface du beurre et les filets de sardine frais pourrait être un des moyens de bioconservation pour contrôler l'oxydation des lipides et la croissance des bactéries pathogènes.

L'ensemble des résultats obtenus nous permettent de dégager de nombreuses perspectives. Il serait souhaitable de :

- ✓ Etudier l'architecture du film par microscope électronique à balayage ;
- ✓ Evaluer le comportement de l'emballage et sa résistance au cours de la conservation ;
- ✓ Etudier l'interaction entre l'emballage et le film ;
- ✓ Suivre la libération de substances actives de l'emballage au cours de la conservation par HPLC ;
- ✓ Essai de valorisation des fruits en stade de maturation vert et jaune en vue de leurs caractéristiques physicochimiques et nutritionnelles intéressantes, et leurs pouvoirs antioxydant et antimicrobien important ;
- ✓ Exploitation de la richesse de fruit en vitamine C dans l'industrie agroalimentaire ;
- ✓ Essai de conservation des aliments à savoir la viande hachée par l'incorporation directe des extraits de fruit à différents stades de maturation.

# **Références bibliographiques**

-A-

**Abid, Y., Azabou, S., Jridi, M., Khemakhem, I., Bouaziz, M., & Attia, H. (2017).** Storage stability of traditional Tunisian butter enriched with antioxidant extract from tomato processing by-products. *Food Chemistry*, 233, 476–482.

**AFNOR (Association Française de Normalisation). (1984).** Corps gras–graines oléagineuses- produits dérivés, 4ème édition, Paris (pp. 459).

**Ahmed, J., Mulla, M., Arfat, Y. A., Bher, A., Jacob, H., & Auras, R. (2018).** Compression molded LLDPE films loaded with bimetallic (Ag-Cu) nanoparticles and cinnamon essential oil for chicken meat packaging applications. *LWT*, 93, 329–338.

**Ahnen, R. T., Jonnalagadda, S. S., & Slavin, J. L. (2019).** Role of plant protein in nutrition, wellness, and health. *Nutrition Reviews*, 0(0), 1-13.

**Alak, G., Hisar, S.A., Hisar, O., Kaban, G., & Kaya, M. (2010).** Microbiological and chemical properties of Bonito fish (*Sarda sarda*) fillets packaged with chitosan film, modified atmosphere and vacuum. *Kafkas Univ. Vet.*

**Alarcão-E-Silva, M., Leitão, A.E.B., Azinheira, H.G., & Leitão, M.C.A. (2001).** The Arbutus Berry: Studies on its Color and Chemical Characteristics at Two Mature Stages. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 27-35.

**Albuquerque, B.R., Prieto, M.A., Barreiro, M.F., Rodrigues, A., Curran, T.P., Barros, L., & Ferreira, I.C.F.R. (2017<sup>b</sup>).** Catechin-based extract optimization obtained from *Arbutus unedo* L. fruits using maceration/microwave/ultrasound extraction techniques. *Industrial Crops and Products*, 95, 404–415.

**Albuquerque, B.R., Prieto, M.A., Barros, L., & Ferreira, I.C.F.R. (2017<sup>a</sup>).** Assessment of the stability of catechin-enriched extracts obtained from *Arbutus unedo* L. fruits: Kinetic mathematical modeling of pH and temperature properties on powder and solution systems. *Industrial Crops and Products*, 99, 150–162.

**Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Morris, M., Baron, M., & Shahidi, F. (2005).** Compositional and sensory characteristics of three native sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties grown in Oman. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33, 7586 – 7591.

**Alkan, D., Aydemir, L.Y., Arcan, I., Yavuzdurmaz, H., Atabay, H. I., Ceylan, C., & Yemenicioğlu, A. (2011).** Development of flexible antimicrobial packaging materials against *Campylobacter jejuni* by incorporation of gallic acid into zein-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (20), 11003-11010.

**Annunziata, G., Maisto, M., Schisano, C., Ciampaglia, R., Narciso, V., Tenore, G. C., & Novellino, E. (2019).** Effects of Grape Pomace Polyphenolic Extract (Taurisol®) in Reducing TMAO Serum Levels in Humans: Preliminary Results from a Randomized, Placebo-Controlled, Cross-Over Study. *Nutrients*, 11(1), 139.

**AOAC. (2000).** Official Methods of Analysis. 17<sup>th</sup>Ed. Maryland, U.S.A (pp. 360).

**AOAC. (2002).** Official Methods of Analysis. 17<sup>th</sup> Ed. Gaithersburg, U.S.A (pp. 480).

**Armenteros, M., Morcuende, D., Ventanas, S., & Estévez, M. (2013),** Application of natural antioxidants from strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) and dog rose (*Rosa canina* L.) to frankfurters subjected to refrigerated storage. *Journal of Integrative Agriculture*, 12, 1972–1981.

**Arvanitoyannis, I.S., & Oikonomou, G. (2012).** Active and intelligent packaging. In: Arvanitoyannis, I.S. Modified atmosphere and active packaging technologies. Boca Raton, Florida, U.S.A., CRC Press (pp. 54- 628).

**ASTM:** Annual book of ASTM standards (1989). American Society for Testing and Materials.

**Ayaz, F.A., Kucukislamoglu, M., & Reunanen M. (2000).** Sugar, non-volatile and phenolic acids composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L. var. *ellipsoidea*) Fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13, 171–177.

**-B-**

**Balkan, İ.A., Taşkın, T., Şah, E.A., Akaydın, G., & Yeşilada, E. (2020).** Comparative study of the anti-inflammatory, antioxidant and urease inhibitory activities of *Eryngium kotschy* Boiss. and *E. campestre* L. var. *virens* (Link) Weins extracts. *Journal of Research in Pharmacy*, 24(3), 399-409.

- Barros, L., Carvalho, A., Morais, J., & Ferreira, I. (2010).** Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterization in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry*, 120, 247-254.
- Barros, L., Heleno, S.A., Carvalho, A.M., & Ferreira, I.C.F.R. (2009).** Systematic evaluation of the antioxidant potential of different parts of *Foeniculum vulgare* Mill. from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 10.1016.
- Barth, A. (2007).** Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767 (9), 1073-1101.
- Ben salem, I., Ouesleti, S., Mabrouk, Y., Landolsi, A., Saidi, M., & Boulilla, A. (2018).** Exploring the nutraceutical potential and biological activities of *Arbutus unedo* L. (*Ericaceae*) fruits. *Industrial Crops and Products*, 122, 726–731.
- Bermúdez-Oria, A., Rodríguez-Gutiérrez, G., Vioque, B., Rubio-Senent, F., & Fernández-Bolaños, J. (2017).** Physical and functional properties of pectin-fish gelatin films containing the olive phenols hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol. *Carbohydrate Polymers*, 178, 368–377.
- Bettani, S.R., de Oliveira Ragazzo, G., Leal Santos, N., Kieckbusch, T.G., Gaspar Bastos, R., Soares, M.R., & Altenhofen da Silva, M. (2019).** Sugarcane vinasse and microalgal biomass in the production of pectin particles as an alternative soil fertilizer. *Carbohydrate Polymers*, 203, 322–330.
- Bitencourt, C.M., Fávaro-Trindade, C.S., Sobral, P.J.A., & Cavalho, R.A. (2014).** Gelatin-based films additivated with curcuma ethanol extract: Antioxidant activity and physical properties of films. *Food Hydrocolloids*, 40, 145–152.
- Bodini, R.B., Sobral, P.J. A., Favaro-Trindade, C. S., & Carvalho, R. A. (2013).** Properties of gelatin-based films with added ethanol–propolis extract. *LWT - Food Science and Technology*, 51(1), 104–110.
- Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., & Simões, M. (2013).** Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 19(4), 256–265.

**Bouarab Chibane, L., Degraeve, P., Ferhout, H., Bouajila, J., & Oulahal, N. (2019).** Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(4), 1457–1474.

**Boullard, B. (2001).** Plantes Médicinales du Monde; Réalités et Croyances, Edition *ESTEM* (pp.50-80).

**Boussalah, N., Boussalah, D., Cebadera-Miranda, L., Fernández-Ruiz, V., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., Cortes Sanchez Mata, M., & Madani, K. (2018).** Nutrient composition of Algerian strawberry-tree fruits (*Arbutus unedo* L.), Fruits, *The International Journal of Tropical and Subtropical Horticulture*, 73(5), 283-297.

**Bradley, R.L. (2010).** Moisture and Total Solids Analysis. In: **Nielsen, S.S.,** (Ed). Food Analysis, Boston, MA: Springer US (pp. 85-104).

**Bretaudeau, J., & Fauré, Y. (1992).** Atlas d'arboriculture fruitière. Ed .Tec et Doc. Paris. (pp.289).

**Brewer, M.T., Lang, L., Fujimura, K., Dujmovic, N., Gray, S., & Van der Knaap, E. (2006).** Development of a controlled vocabulary and software application to analyze fruit shape variation in tomato and other plant species. *Plant Physiology*, 141, 15–25.

**Broek, L.A.M., Knoop, R.J.I., Kappen, F.H.J., & Boeriu, C.G. (2015).** Chitosan films and blends for packaging material. *Carbohydrate Polymers*, 116, 237–242.

**Buege, J., & Aust, S. (1978).** Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 302–310.

-C-

**Çakmak, H., Bozdoğan, N., Turkut, M.G., Kumcuoğlu, S., & Tavman, Ş. (2016)** Evaluation of drying kinetics of *Arbutus unedo* L. fruit and determination of quality characteristics. *Gıda, Journal of food*, 41(4), 227-234.

**Campos, C.A., Gerschenson, L.N., & Flores, S.K. (2010).** Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food Bioprocess Technology*, 4, 849–875.

**Cavaco, T., Longuinho, C., Quintas, C., & Carvalho, I.S. (2007).** Chemical and microbial changes during the natural fermentation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Journal of Food Biochemistry*, 31, 715–725.

- Celikel, G., Demirsoy, L., & Demirsoy, H. (2008).** The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) selection in Turkey. *Scientia Horticulturae*, 118, 115–119.
- Chang, Y., Sun, R., Sun, H., Zhao, Y., Han, Y., Chen, D., Wang, Y., Zhang, X., & Han, Z. (2014).** Mapping of quantitative trait loci corroborates independent genetic control of apple size and shape. *Scientia Horticulturae*, 174, 126-132.
- Chibane, L.B., Degraeve, P., Ferhout, H., Bouajila, J., & Oulahal, N. (2018).** Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 1457–1474.
- Choe, E., & Min, D. B. (2006).** Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Comprehensive Food Science and Food Safety*, 5(4), 169–186.
- Chung, Y.C., Chang, C.T., Chao, W.W., Lin, C.F., & Chou, S.T. (2002).** Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMRNK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2454–2458.
- Ciancaglini, P., Santos, H.L., Daghanli, K.R.P., Thedei Jr., G. (2001).** Using a classical method of vitamin C quantification as a tool for discussion of its role in the body. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 29, 110-114.
- CLSI. (2013).** Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-third Informational Supplement M100-S23, Wayne, PA, USA.
- Cossu, M., Juliano, C., Pisu, R., & Alamanni, M.C. (2009).** Effects of enrichment with polyphenol extracts from Sardinian plants on physico-chemical, antioxidant and microbiological properties of yogurt. *Italian Journal of Food Sciences*, 21, 447–459.
- D-**
- Dammak, I., & Sobral, P.J.D.A. (2019).** Active gelatin films incorporated with eugenol nanoemulsions: effect of emulsifier type on films properties. *International Journal of Food Science & Technology*, 54, 2725–2735.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. (2007).** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 43, 348–361.

**Dauthy, M., E. (1995).** Fruit and vegetable processing, FAO agricultural services bulletin No.119, Rome. pp 249.

**De Sousa, E. P., de Figueirêdo, R. M. F., Queiroz, A. J. M., Silva, L. M. M., & de Sousa, F. C. (2012).** Physicochemical characterization of sapoti pulp from the state of Ceará. *Green*, 7, 45–48.

**Delgado-Pelayo, R., Gallardo-Guerrero, L., & Hornero-Mendez, D. (2016).** Carotenoid composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Food Chemistry*, 199, 165–175.

**Demirsoy, H., Demirsoy, L., Çelikel, G., Koyuncu, T. (2007).** Effects of Dried on some properties of Strawberry Tree Fruits. *Asian journal of chemistry*, 19(3), 1777-1782.

**Diane, M. B., Somogyi, L., & Ramaswamy H. S. (2004).** Processing Fruits: Science and Technology, 2 Ed, CRC Press, Amazon, France, pp 864.

**Dib, M.A., Allali, H., Bendiabdellah, A., Meliani, N, & Tabeti, B. (2013).** Antimicrobial activity and phytochemical screening of *A. unedo* L. *Journal of Saudi Chemical Society*, 17, 381–395.

**Djipa, C.D., Delmee, M., & Quentin-Leclercq, J. (2000).** Antimicrobial activity of bark extract of *Syzygium jambos* (*Myrtaceae*). *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 307–313.

**Dole, P., Joly, C., Espuche, E., Alric, I., & Gontard, N. (2004).** Gas transport properties of starch based films. *Carbohydrate Polymers*, 58, 335–343.

**Dorais, M., Papadopoulos, A. P., & Gosselin, A. (2001).** Influence of electric conductivity management on greenhouse tomato yield and fruit quality. *Agronomie*, 21, 367-383.

**Doukani, K., & Tabak S. (2014).** Profil Physicochimique du fruit "Lendj" (*Arbutus unedo* L.). *Nature & Technology*, 57- 71.

**Dubois, M.K.A., Gilli, Y.K., & Hamilton, P.A. (1956).** Colometric method for determination of sugar and related substances. *Analytical et chemistry Journal*, 28, 350-356.

**-E-**

**Elsabee, M.Z., & Abdou, E.S. (2013).** Chitosan based edible films and coatings: a review. *Materials Science and Engineering*, 33, 1819–1841.



**Erkan, N., Tosun, Ş. Y., Ulusoy, Ş., & Üretener, G. (2010).** The use of thyme and laurel essential oil treatments to extend the shelf life of bluefish (*Pomatomus saltatrix*) during storage in ice. *Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, 6(1), 39–48.

**Esquenazi, D., Wigg, M.D., Miranda, M.M.F.S., Rodrigues, H.M., Tostes, J.B.F., & Rozental, S. (2002).** Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (*Palmae*) husk fiber extract. *Research in Microbiology*, 53, 647–652.

**Etienne, A., Génard, M., Bancel, D., Benoit, S., Nonone, M., Barre, F., & Bugaud, C. (2015).** Modeling changes in pH and titratable acidity during the maturation of dessert banana. *Acta Horticulturae*, (1099), 807–814.

**Etienne, A., Génard, M., Lobit, P., Mbéguié-A-Mbéguié, D., & Bugaud, C. (2013).** What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells. *Journal of Experimental Botany*, 64(6), 1451–1469.

**Etxabide, A., Uranga, J., Guerrero, P., & De la Caba, K. (2017).** Development of active gelatin films by means of valorisation of food processing waste: A review. *Food Hydrocolloids*, 68, 192–198.

**European Parliament and Council. (2011).** Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers. *Official Journal of the European Union*, 22112011: L304/18-L304/63.

-F-

**Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., & Abdelly, C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 372-379.

**Fan, W., Chi, Y., & Zhang, S. (2008).** The use of a tea polyphenol dip to extend the shelf life of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) during storage in ice. *Food Chemistry*, 108, 148–153.

**Fang, Z., & Bhandari, B. (2010).** Encapsulation of polyphenols: a review. *Trends in Food Sciences and Technology*, 21, 510–523.

**FAO. (2010).** The contribution of plant genetic resources for food and agriculture to food security and sustainable agricultural development. In: **Diouf, J. (Ed.)**, The Second Report on

the State of the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture (pp. 183–198). Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture of the Food and Agriculture Organization of the United Nations.

**Feng, X., Ng, V.K., Mikš-Krajnik, M., & Yang, H. (2017).** Effects of fish gelatin and tea polyphenol coating on the spoilage and degradation of myofibril in fish fillet during cold storage. *Food and Bioprocess Technology*, 10(1), 89–102.

**Fiuza, S. M., Gomes, C., Teixeira, L. J., Girao da Cruz, M. T., Cordeiro, M. N., Milhazes, N., Borges, F., & Marques, M. P. (2004).** Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties-a structure-activity relationship study, Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12 (13), 3581–3589.

**Fonseca, D., Salvador, Â., Santos, S., Vilela, C., Freire, C., Silvestre, A., & Rocha, S. (2015).** Bioactive Phytochemicals from Wild *Arbutus unedo* L. Berries from Different Locations in Portugal: Quantification of Lipophilic Components. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 14194–14209.

**Fortalezas, S., Tavares, L., Pimpao, R., Tyagi, M., Pontes, V., Alves, P.M., McDougall, G., Stewart, D., Ferreira, R.B., & Santos, C.N. (2010).** Antioxidant properties and neuroprotective capacity of strawberry tree fruit (*Arbutus unedo*). *Nutrients*, 2, 214–229.

**Fredot, E. (2017).** *Connaissance des aliments, Le manuel*, (4<sup>ème</sup> Ed), Lavoisier, TEC & DOC, paris (pp. 580).

**-G-**

**Gallego, M., Arnal, M., Talens, P., Toldrá, F., & Mora, L. (2020).** Effect of Gelatin Coating Enriched with Antioxidant Tomato By-Products on the Quality of Pork Meat. *Polymers*, 12(5), 1032.

**Gálvez, A., Burgos, M. J. G., López, R. L., & Pulido, R. P. (2014).** *Food Biopreservation*. New York (pp. 3).

**Ganesan, K., Kumar, K.S., & Rao, P.V.S. (2011).** Comparative assessment of antioxidant activity in three edible species of green seaweed, *Enteromorpha* from Okha, Northwest coast of India. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12,73–78.

- Ganhão, R., Estévez, M., Armenteros, M., & Morcuende, D. (2013).** Mediterranean berries as inhibitors of lipid oxidation in porcine burger patties subjected to cooking and chilled storage. *Journal of Integrative Agriculture*, 12, 1982–1992.
- Ganhão, R., Estévez, M., Kylli, P., Heinonen, M., & Morcuende, D. (2010).** Characterization of selected wild Mediterranean fruits and comparative efficacy as inhibitors of oxidative reactions in emulsified raw pork burger patties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8854–8861.
- Ganhão, R., Morcuende, D., & Estévez, M. (2010).** Protein oxidation in emulsified cooked burger patties with added fruit extracts: Influence on colour and texture deterioration during chill storage. *Meat Sciences*, 85, 402–409.
- Gomes, M.F.F.N. (2011).** Strategies for the Improvement of *Arbutus unedo* L. (Strawberry Tree): *In vitro* Propagation, Mycorrhization and Diversity Analysis. Ph.D.Thesis, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, 128-130.
- Gómez-Estaca, J., López-De-Dicastillo, C., Hernández-Munoz, P., Catalá, R., & Gavara, R. (2014).** Advances in antioxidant active food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 35, 42–51.
- Gómez-Estaca, J., Montero, P., Fernandez-Martín, F., Aleman, A., & Gomez-Guillen, M.C. (2009).** Physical and chemical properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films with added aqueous oregano and rosemary extracts. *Food Hydrocolloids*, 23, 1334–1341.
- Gómez-Guillén, M. C., Ihl, M., Bifani, V., Silva, A., & Montero, P. (2007).** Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugnimolinae Turcz*). *Food Hydrocolloids*, 21, 1133–1143.
- González, E.A., Agrasar, A.T., Castro, L.M., Fernández, I.O., & Guerra, N.P. (2011).** Solid-state fermentation of red raspberry (*Rubus idaeus* L.) and *Arbutus* berry (*Arbutus unedo* L.) and characterization of their distillates. *Food Research International*, 44, 1419– 1426.
- Gordon, M.H. (2004).** Factors affecting lipid oxidation. In: **Steele, R.** Understanding and Measuring the Shelf-Life of Food, Woodhead Publishing Limited, Cambridge England (pp.128–141).

**Goulas, A.E., & Kontominas, M.G. (2007).** Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*, 100, 287–296.

**Goy, R.C., Britto, D., & Assis, O.B.G. (2009).** A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*, 9, 241–247.

**Guarro, J., Svidzinski, T.E., Zaror, L., Forjaz, M.H., Gene, J., & Fischman O. (1998).** Subcutaneous Hyalohyphomycosis Caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(10), 3060–3065.

**Guimarães, R., Barros, L., Calhella, R.C., Carvalho A.M., Queiroz, M.J.R.P., & Ferreira, I.C.F.R.. (2014).** Bioactivity of different enriched phenolic extracts of wild fruits from northeastern Portugal: A comparative study. *Plant Foods for Human Nutrition*, 69(1): 37–42.

**Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Queiroz, M.J.R.P., Santos-Buelg, C., & Ferreira, I.C.F.R. (2013).** Characterization of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. *Food Chemistry*, 141, 3721–3730.

**Guiraud, J.P. (2003).** Microbiologie alimentaire. Industries agroalimentaires, Technique et ingénierie, Dunod (pp. 651).

**Gulcin, İ. (2020).** Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, 94, 651–715.

**Gulen, T., Bayram, K., Nazan, C., & Ahmet, G. (2012).** Free radical scavenging activity and phenolic content of edible wild fruits from Kazdagi (Ida Mountains), Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(36), 4992.

**-H-**

**Haddar, A., Sellimi, S., Ghannouchi, R., Alvarez, O.M., Nasri, M., & Bougatef, A. (2012).** Functional, antioxidant and film-forming properties of tuna-skin gelatin with a brown algae extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(4), 477–483.

**Han, J., & Floros, J. (1997).** Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. *Journal of Plastic Film and Sheet*, 13, 287–298.

**Han, J.H. (2005).** New technologies in food packaging: overview. In: **Han, J. H.** Innovations in food packaging, Elsevier Science & Technology Books (pp. 482).

**Hashim, P., Mohd Ridzwan, M.S., Bakar, J., & Mat Hashim, D. (2015).** Collagen in food and beverage industries. *International Food Research Journal*, 22(1), 1–8.

**He, L., Mu, C., Shi, J., Zhang, Q., Shi, B., & Lin, W. (2011).** Modification of collagen with a natural cross-linker, procyanidin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48 (2), 354-359.

**Hegedüs, A., Pfeiffer, P., Papp, N., Abrankó, L., Blázovics, A., & Pedryc, A., (2011).** Accumulation of antioxidants in apricot fruit through ripening: characterization of a genotype with enhanced functional properties. *Biological Research*, 44, 339-344.

**Ho, K.Y.T., Sai, C.C., Huang, J.S., Chen, C.P., Lin, T.C., & Lin, C.C. (2001).** Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitisidaea* L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 187–191.

**Holck, A.L., Pettersen, M.K., Moen, M.H., & Sørheim, O. (2014).** Prolonged shelf life and reduced drip loss of chicken filets by the use of carbon dioxide emitters and modified atmosphere packaging. *Journal of Food Protection*, 77(7), 1133–41.

**Hultin, H.O. (1992).** Lipid oxidation in fish muscle. In: Flick, G.J, & Martin, R.E. (Eds). *Advances in seafood biochemistry: composition and quality*. Technomics Publishing Company Inc, Lancaster (pp. 99–122).

**-I-**

**ICMSF: International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (1986).** Microorganisms in foods. In: *Sampling for microbiological analysis: principles and scientific applications*, volume 2, 2<sup>nd</sup> Ed., Toronto (pp. 188).

**Inari, T., Yamauchi, R., Kato, K., & Takeuchi, T. (2000).** Purification and some properties of pectinesterase from fruits of a miniature-fruited red type tomato. *Food Science and Technology Research*, 6, 54-58.

**Isbilir, S.S., Orak, H.H., Yagar, H., & Ekinci, N. (2012).** Determination of antioxidant activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) flowers and fruits at different ripening stages. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 11(3), 223-237.

**-J-**

**Jeong, S.M., Kim, S.Y., Kim, D.R., Jo, S.C., Nam, K.C., Ahn, D.U., & Lee, S.C. (2004).** Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 3389–3393.

**Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2012).** Edible and Biodegradable Starch Films: A Review. *Food Bioprocess Technology*, 5, 2058–2076.

**Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Prodpran, T., & Tanaka, M. (2006).** Characterization of edible films from skin gelatin of brownstripe red snapper and bigeye snapper. *Food Hydrocolloids*, 20, 492–501.

**Jorge, A., Aguirre-Joya, M., De Leon-Zapata, A., Alvarez-Perez, O. B., Torres-León, C., Nieto-Oropeza, D. E., Ventura-Sobrevilla, J. M., Aguilar, M. A., Ruelas-Chacón, X., Rojas, R., Ramos-Aguñaga, M.E., & Aguilar, C. N. (2018).** Basic and Applied Concepts of Edible Packaging for Foods. In: **Grumezescu, A.M., & Holban, A. M.** Food Packaging and Preservation, Handbook of Food Bioengineering, Volume 9, Academic Press ,Elsevier, London (pp.1-60).

**Jridi, M., Mora, L., Souissi, N., Aristoy, M.C., Nasri, M., & Toldrá, F. (2018).** Effects of active gelatin coated with henna (*L. inermis*) extract on beef meat quality during chilled storage. *Food Control*, 84, 238–245.

**Julkunen-Titto, R. (1985).** Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33, 213-217.

**-K-**

**Kahriman, N., Albay C.G., Dogan, N., Usta, A., Karaoglu, S.A., & Yayli, N. (2010).** Volatile constituents and antimicrobial activities from flower and fruit of *Arbutus unedo* L. *Asian Journal of Chemistry*, 22, 6437–6442.

**Kajiya, K., Kumazawa, S., & Nakayama, T. (2002).** Effects of external factors on the interaction of tea catechins with lipid bilayers. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66, 2330–2335.

**Kang, K.A., Chae, S., Lee, K.H., Zhang, R., Jung, M.S., You, H.J., Kim, J.S., & Hyun, J.W. (2005).** Antioxidant effect of homogenetic acid on hydrogen peroxide induced oxidative stress in human lung fibroblast cells. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10 (6), 556.

**Kapetanakou, A.E., Agathagelou, E.I., & Skandamis, P.N. (2014).** Storage of pork meat under modified atmospheres containing vapors from commercial alcoholic beverages. *International Journal of Food Microbiology*, 178, 65-75.

**Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013).** Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18, (2), 2328–2375.

**Kim, T.L. (2012).** Edible Medicinal and Non- Medicinal Plants. Dordrecht. New York, USA (pp. 2, 444-451).

**Kjeldhal, J. (1883).** A New Method for the Determination of Nitrogen in Organic Matter. *Analytical Chemistry*, 22, 366-382.

**Kowalczyk, D. (2016).** Biopolymer/candelilla wax emulsion films as carriers of ascorbic acid—a comparative study. *Food Hydrocolloids*, 52, 543–553.

**Koyuncu, M., & Tuncturk, Y. (2017).** Effect of packaging method and light exposure on oxidation and lipolysis in butter. *Oxidation Communications*, 40(2), 785–798.

**Kriechbaum, K., & Bergström, L. (2020).** Antioxidant and UV-blocking leather-inspired nanocellulose-based films with high wet strength. *Biomacromolecules*, 21, 1720–1728.

**-L-**

**Laguerre, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (2007).** Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46, 244–282.

**Lamare, R.L., Bidyut, C.D., Nath, A., & Patel, R.K. (2013).** Dynamics of Physico-Chemical Values in *Sohshang* (*Elaeagnus latifolia* L.) across Maturity. *Indian Journal of Hill Farming*, 26(2), 49-53.

**Leceta, I., Guerrero, P., Cabezudo, S., & Caba, K.D. (2013).** Environmental assessment of chitosan-based films. *Journal of Cleaner Production*, 41, 312–318.

- Lecoq, R. (1965).** Manuel d'analyses alimentaires et d'expertises usuelles. Doin, Paris (pp. 1304-1311).
- Leonti, M., Casu, L., Sanna, F., & Bonsignore, L. (2009).** A comparison of medicinal plant use in Sardinia and Sicily—De Materia Medica revisited? *Journal of Ethnopharmacology*, 121, 255-267.
- Li, A., Chen, J., Zhu, W., Jiang, T., & Zhang, X. (2007).** Antibacterial activity of gallic acid from the flowers of *Rosa chinensis* Jacq. Against fish pathogens. *Aquaculture Research*, 38(10), 1110-1112.
- Li, L., Wang, H., Chen, M., Jiang, S., Cheng, J., Li, X., Zhang, M., & Jiang, S. (2020).** Gelatin/zein fiber mats encapsulated with resveratrol: Kinetics, antibacterial activity and application for pork preservation. *Food Hydrocolloids*, 101, 105577.
- Li, X., He, C., Song, L., Li, T., Cui, S., Zhang, L., & Jia, Y. (2017).** Antimicrobial activity and mechanism of Larch bark procyanidins against *Staphylococcus aureus*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 49, 1058–1066.
- Liu, L., Fishman, M.L., & Hicks, K.B. (2007).** Pectin in controlled drug delivery—A review. *Cellulose*, 14, 15–24.
- Locatelli, C., Leal, P.C., Yunes, R.A., Nunes, R.J., & Creczynski-Pasa, T.B. (2009).** Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: The relationship between free radical generation, glutathione depletion and cell death. *Chemico-Biological Interactions*, 181, 175–184.
- Lopes, R., Bruckner, C.H., Cruz, C.D., & Freitas, G.B. (2001).** Repeatability of characteristics of acerola fruit. *Brazilian Agricultural Research*, 36, 507–513.
- López, O.V., García, M.A., & Zaritzky, N.E. (2008).** Film forming capacity of chemically modified corn starches. *Carbohydrate Polymers*, 73(4), 573–581.
- López-Caballero, M.E., Martínez-Alvarez, O., Gómez-Guillén, M.D. & Montero, P. (2007).** Quality of thawed deep water pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) treated with melanosis-inhibiting formulations during chilled storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 42(9), 1029–1038.



**Lopez–Rubio, A., Gavara, R., Lagaron, J.M. (2006).** Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials. *Trends Food Science and Technology*, 17, 567–575.

**Lougovois, V.P., & Kyrana, V.R. (2005).** Freshness quality and spoilage of chill-stored fish. In: **Riley, A.P.** Food Policy, Control and Research (pp. 35-86).

**Luís, Â., Silva, F., Sousa, S., Duarte, A.P., & Domingues, F. (2014).** Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids. *Biofouling*, 30, 69–79.

**Lv, F., Liang, H., Yuan, Q., & Li, C. (2011).** In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, 44, 3057–3064.

-M-

**Maleš, Ž., Plazibat, M., Vundać, V.B., & Žuntar, I. (2006).** Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree—*Arbutus unedo* L. (*Ericaceae*). *Acta Pharmaceutica*, 56, 245–250.

**Malheiro, R., Sá, O., Pereira, E., Aguiar, C., Baptista, P., & Pereira, J. A. (2012).** *Arbutus unedo* L. leaves as source of phytochemicals with bioactive properties. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 473–478.

**Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747.

**Mariotto, S., Esposito, E., Paola, R.D., Ciampa, A., Mazzon, E., Prati, A.C., Darra, E., Vincenzi, S., Cucinotta, G., & Caminiti, R. (2008).** Protective effect of *Arbutus unedo* aqueous extract in carrageenan-induced lung inflammation in mice. *Pharmacological Research*. 57, 110–124.

**Marmonier, A. A. (1990).** Introduction aux techniques d'étude des antibiotiques. Bactériologie Médicale, technique usuelles, Doin, Paris.

- Martucci, J.F., Gende, L.B., Neira, L.M., & Ruseckaite, R.A. (2015).** Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. *Industrial Crops and Products*, 71, 205–213.
- Masmoudi, M., Ammar, I., Ghribi, H., & Attia, H. (2020).** Physicochemical, radical scavenging activity and sensory properties of a soft cheese fortified with *Arbutus unedo* L. extract. *Food Bioscience*, 35, 100579.
- Matche, R.S., Anup, G.J., & Mrudula, G. (2020).** Development of Biodegradable Films from Marine Ingredients Incorporated with Natural Antimicrobial Agents for Food Packaging. *Journal of Packaging Technology and Research*, 4, 45-55.
- Mattila, P., Hellstrom, J., & Torronen, R. (2006).** Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7193–7199.
- Mellinas, C., Ramos, M., Grau-Atienza, A., Jordà, A., Burgos, N., Jiménez, A., Serrano, E., & Garrigós, M.C. (2020).** biodegradable poly( $\beta$ -caprolactone) active films loaded with msu-x mesoporous silica for the release of  $\alpha$ -tocopherol. *Polymers*, 12, 137.
- Mellinas, C., Valdés, A., Ramos, M., Burgos, N., Del Carmen Garrigós, M., & Jiménez, A. (2016).** Active edible films: Current state and future trends. *Journal of Applied Polymer Science*, 133, 42631.
- Mendes, L. (2010).** Estudo do efeito protector da folha e fruto da espécie *Arbutus unedo* L. nadanificação oxidative emeritrocitoshumanos, Universidade Fernando Pessoa, Porto.
- Mendes, L., de Freitas, V., Baptista, P., & Carvalho, P. (2011).** Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2285–2291.
- Méndez-Cid, F.J., Centeno, J.A., Martínez, S., & Carballo, J. (2017).** Changes in the chemical and physical characteristics of cow's milk butter during storage: Effects of temperature and addition of salt. *Journal of Food Composition and Analysis*, 63, 121–132.
- Miguel, M., Faleiro, M., Guerreiro, A., & Antunes, M. (2014).** *Arbutus unedo* L.: Chemical and Biological Properties. *Molecules*, 19, 15799-15823.

**Mohan, C., Ravishankar, C.N., & Srinivasagopal, T.K. (2008).** Effect of O<sub>2</sub> scavenger on the shelf-life of catfish (*Pangasius sutchi*) steaks during chilled storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 442–448.

**Mol, S., Erkan, N., Uçok, D., & Tosun, S. Y. (2007).** Effect of psychrophilic bacteria to estimate fish quality. *Journal of Muscle Food*, 18, 120–128.

**Molina, M., Pardo-de-Santayana, M., Aceituno, L., Morales, R., & Tardío, J. (2011).** Fruit production of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) in two Spanish forests. *Forestry*, 84, 419-429.

**Moller, J. (2003).** L'oxydation des aliments et la santé. Nouvelle Imprimerie Laballery, Paris, (pp. 250).

**Moradi, M., Tajik, H., Razavi Rohani, S.M., Oromiehie, A.R., Malekinejad, H., Aliakbarlu, J., & Hadian, M. (2012).** Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. *LWT—Food Science and Technology*, 46, 477–484.

**Moualek, I., Aiche, G.I., Guechaoui, N.M., Lahcene, S., & Houali, K. (2016).** Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Arbutus unedo* aqueous extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(11), 937-944.

**Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A.M., & Böhm, V. (2010).** Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *Food Science and Technology*, 43, 992–999.

**Multon, J.L. (1991).** Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. Analyse des constituants alimentaires, Volume 4, 2<sup>ème</sup> Ed. Tech et Doc-Lavoisier, Paris (pp.121-137).

**Murgić, Z. H., Rešček, A., Siročić, A. P., Krehula, L. K., & Katančić, Z. (2015).** Nanoparticles. In: **Smithers, A.** Active Polymer Food Packaging, Group CompanyShawbury, Shrewsbury, Shropshire, SY4 4NR, United Kingdom (pp. 56).

-N-

**Naczk, M., Grant, S., Zadernowski, R., & Barre, E. (2006).** Protein precipitating capacity of phenolics of wild blueberry leaves and fruits. *Food Chemistry*, 96, 640–647.

**Nascimento, V.E., Martins, A.B.G., & Hojo, R.H. (2008).** Physical and chemical characterization of MAMEY fruits. *Brazilian Journal of Fruticulture*, 30, 953–957.

**Ndhlala, A.R., Kasiyamhuri, A., Mupure, C., Chitindingue, K., benhura, M.A., & Muchuweti, M. (2006).** Phenolic composition of *Flacourtia indica*, *Opuntia megacantha* and *Sclerocarya birrea*. *Food Chemistry*, 103(2007), 82–87.

**NF EN ISO 734-1 (2000).** Tourteaux et graines oléagineuses. Détermination de la teneur en huile.

**NF V05-101 (01/1974).** Produits dérivés des fruits et légumes - Détermination de l'acidité titrable.

**Nguyen Van Long, N., Joly, C., & Dantigny, P. (2016).** Active packaging with antifungal activities. *International Journal of Food Microbiology*, 220, 73–90.

**Nor Adilah, A., Jamilah, B., Noranizan, M. A., & Hanani, Z.A.N. (2018).** Utilization of mango peel extracts on the biodegradable films for active packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 16, 1–7.

**-O-**

**O'Connor, T.P., & O'Brien, N.M. (2006).** Lipid oxidation. In: **Fox, P.F., & McSweeney, P.L.H. (Eds.)** Advanced dairy chemistry. Volume 2, New York, NY, USA: Springer (pp. 557-600).

**Ogaya R., & Peñuelas J., (2004).** Phenological patterns of *Quercus ilex*, *Phillyrea latifolia*, and *Arbutus unedo* growing under a field experimental drought. *Ecoscience*, 11, 263–270.

**Oliveira, I., Baptista, P., Malheiro Casal, R.S.A.B., & Pereira, J.A. (2011).** Influence of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity. *Food Research International*, 44, 1401–1407.

**Oliveira, V. (2010).** Caracterização fitoquímica de folhas e frutos de *Arbutus unedo* L. Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar : *Escola Superior Agrária*. Bragança.

- Orak, H.H., Aktas, T., Yagar, H., Isbilir, S.S., Ekinci, N., & Sahin, F.H. (2012).** Effects of hot air and freeze drying methods on antioxidant activity, colour and some nutritional characteristics of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit. *Food Science and Technology International*, 18(4), 391–402.
- Orak, H.H., Aktas, T., Yagar, H., Selen Isbilir, S., Ekinci, N., & Sahin, F.H., (2011).** Antioxidant activity, some nutritional and colour properties of vacuum dried strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 10, 327-338.
- Ortega-Toro, R., Jiménez, A., Talens, P., & Chiralt, A. (2014).** Properties of starchhydroxypropyl methylcellulose based films obtained by compression molding. *Carbohydrate Polymers*, 109(30), 155–165.
- Ortiz-Zarama, M.A., Jiménez-Aparicio, A.R., & Solorza-Feria, J. (2016).** Obtainment and partial characterization of biodegradable gelatin films with tannic acid, bentonite and glycerol. *Journal of Food Science and Agriculture*, 96, 3424–3431.
- Owen, S., Boissard, C., Street, R., Duckham, S., Csiky, O., & Hewitt, C. (1997).** Screening of 18 Mediterranean plant species for volatile organic compound emissions. *Atmospheric Environment*, 31, 101–117.
- Oyaizu, M., (1986).** Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine, *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
- Özcan, M.M., & Haciseferoğulları, H., (2007).** The strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits:Chemical composition, physical properties and mineral contents. *Journal of Food Engineer*, 44, 307-315.
- Ozdemir, M., & Floros, J.D. (2004).** Active Food Packaging Technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 185–193.
- Özkanli, O., & Kaya, A. (2007).** Storage stability of butter oils produced from sheep's non-pasteurized and pasteurized milk. *Food Chemistry*, 100(3), 1026–1031.
- Ozogul, Y., Yuvka, İ., Ucar, Y., Durmus, M., Kösker, A.R., Öz, M., & Ozogul, F. (2017).** Evaluation of effects of nanoemulsion based on herb essential oils (rosemary, laurel, thyme and sage) on sensory, chemical and microbiological quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during ice storage. *LWT–Food Science and Technology*, 75, 677–684.

**-P-**

- Paes, S.S., Yakimets, I., & Mitchell, J.R. (2008).** Influence of gelatinization process on functional properties of cassava starch films. *Food Hydrocolloids*, 22, 788–797.
- Pallauf, K., Rivas Gonzalo, J.C., del Castillo, M.D., Cano, M.P., & de Pascual Teresa, S. (2008).** Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 273–281.
- Patel, S., Srivastava, S., Singh, M.R., & Singh, D. (2018).** Preparation and optimization of chitosan-gelatin films for sustained delivery of lupeol for wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107(B), 1888–1897.
- Pawłowska, A.M., De Leo, M., Baraca, A. (2006).** Phenolics of *Arbutus unedo* L. (*Ericaceae*) fruits: identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54(26), 10234-10238.
- Peña, C., de la Caba, K., Eceiza, A., Ruseckaite, R., & Mondragon, I. (2010).** Enhancing water repellence and mechanical properties of gelatin films by tannin addition. *Bioresource Technology*, 101, 6836–6842.
- Peña-Rodriguez, C., Martucci, J. F., Neira, L. M., Arbelaiz, A., Eceiza, A., & Ruseckaite, R.A. (2014).** Functional properties and in vitro antioxidant and antibacterial effectiveness of pigskin gelatin films incorporated with hydrolysable chestnut tannin. *Food Science and Technology International*, 01, 1–11.
- Pérez Espitia, P.J., Avena-Bustillos, R.J., Wen-Xian, Du., Teófilo, R.F., Soares, N.F.F., & McHugh, T.H. (2014).** Optimal antimicrobial formulation and physical–mechanical properties of edible films based on açai and pectin for food preservation. *Food Packaging and Shelf Life*, 2, 38–49.
- Pernin, A., Guillier, L., & Dubois-Brissonnet, F. (2019).** Inhibitory activity of phenolic acids against *Listeria monocytogenes*: Deciphering the mechanisms of action using three different models. *Food Microbiology*, 80, 18–24.
- Pimpão, R.C., Dew, T., Oliveira, P.B., Williamson, G., Ferreira, R.B., & Santos, C.N. (2013).** Analysis of phenolic compounds in Portuguese wild and commercial berries after multienzyme hydrolysis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 61, 4053–4062.

**Podsedek, A., (2007).** Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Science and Technology*, 40, 1-11.

**Prasad, P., & Kochhar, A. (2014).** Active packaging in food industry: a review. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 8, 1–7.

**Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar M. (1999).** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex : specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 337–341.

**Prudent, M., Dai, Z.W., Génard, M., Bertin, N., Causse, M., & Vivin, P. (2014).** Resource competition modulates the seed number–fruit size relationship in a genotype-dependent manner: A modeling approach in grape and tomato. *Ecological Modelling*, 290, 54-64.

**-R-**

**Ramlu P., & Rao, P.U. (2003).** Total insoluble and soluble dietary fiber contents of Indian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 677- 685.

**Ramos, M., Valdes, A., Beltran, A., & Garrigós, M.C. (2016).** Gelatin-based films and coatings for food packaging applications. *Coatings*, 6, 41.

**Ramos, Ó. L., Pereira, R. N., Cerqueira, M. A., Martins, J. R., Teixeira, J. A., Malcata, F. X., & Vicente, A. A. (2018).** Bio-Based Nanocomposites for Food Packaging and Their Effect in Food Quality and Safety. In: **Gr umezescu, A.M., & A. M., Holban.** Food Packaging and Preservation, Handbook of Food Bioengineering, Volume 9, Academic Press ,Elsevier, London (pp. 294).

**Ravishankar, S., Zhu, L., Olsen, C.W., McHugh, T.H., & Friedman, M. (2009).** Edible apple film wraps containing plant antimicrobials inactivate foodborne pathogens on meat and poultry products. *Journal of food sciences*, 74, 440–445.

**Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231–1237.

**Realini, C.E., & Marcos, B., 2014.** Active and intelligent packaging systems for a modern society, *Meat Science*, 98 (3), 404–419.

**Rhim, J.-W., Ng, P.K.W. (2007).** Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 47, 411–433.

**Rosa, A., Tuberoso, C.I.G., Atzeri, A., Melis, M.P., Bifulco, E., & Dess, M.A. (2011).** Antioxidant profile of strawberry tree honey and its marker homogentisic acid in several models of oxidative stress. *Food Chemistry*, 129(3): 1045–1053.

**Roy, S., & Rhim, J.-W. (2019).** Preparation of antimicrobial and antioxidant gelatin/curcumin composite films for active food packaging application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 110761.

**Rubilar, J.F., Cruz, R.M.S., Silva, H.D., Vicente, A.A., Khmelinskii, I. & Vieira, M.C. (2013).** Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. *Journal of Food Engineering*, 115(4), 466–474.

**Ruch, R.J., Cheng, S.J., & Klaunig, J.E. (1989).** Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, 10, 1003-1008.

**Ruiz-Rodriguez, B.M., Morales, P.V., & Fernandez-Ruiz V. (2011).** Valorization of wild strawberry-tree fruits (*Arbutus unedo* L.) through nutritional assessment and natural production data. *Food Research International*, 44, 1244-1253.

-S-

**Sadiq, M.B., Hanpithakpong, W., Tarning, J., & Anal, A.K. (2015).** Screening of phytochemicals and in vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of leaves, pods and bark extracts of *Acacia nilotica* (L.) Del. *Industrial Crops and Products*, 77, 873–882.

**Sánchez-González, L., Vargas, M., González-Martínez, C., Chiralt, A., & Cháfer, M., (2011).** Use of essential oils in bioactive edible coatings: a review. *Food Engineering Reviews*, 3, 1–16.

**Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., & Saura-Calixto F. (1998).** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 270–276.



**Sancho-Madriz, M.F.** (2003). "Preservation of Food". In Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Ed. Caballero, B.), IInd Edition, Elsevier Science Ltd Publisher.

**Sangerlaub, S., Gibis, D., Kirchoff, E., Tittjung, M., Schmid, M., & Müller, K. (2013a).** Compensation of pinhole defects in food packages by application of iron-based oxygen scavenging multilayer films. *Packaging Technological Science*, 26(1), 17–30.

**Santos, D.E., Galego, L., Gonçalves, T., & Quintas, C. (2012).** Yeast diversity in the Mediterranean strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits' fermentations. *Food Research International*, 47, 45– 50.

**Schaffer, S., Heinrich, M., Leonti, M., Nebel, S., Peschel, W., Pieroni, A., Smith, F., Rivera, D., Ob, C., Inocencio C., et al. (2005).** Understanding local mediterranean diets: A multidisciplinary pharmacological and ethnobotanical approach. *Pharmacological Research*, 52,353–366.

**Scortichini, M. (1986).** Il mirto. *Rivista di frutticoltura e diortofloricoltura*, 48,47-53.

**Seidemann J. (1995).** Description of exotic fruits – arbutus (*Arbutus-unedo* L). *Dtsch. Lebensm.-Rundsch*, 91(4), 110-113.

**Serçe, S., Özgen, M., Torun, A.A., & Ercisli, S. (2010).** Chemical composition, antioxidant activities and total phenolic content of *Arbutus andrachne* L. (Fam. *Ericaceae*) (the Greek strawberry tree) fruits from Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 619-623.

**Shah, S., Stapleton, P.D., & Taylor, P.W. (2008).** The polyphenol (-)epicatechin gallate disrupts the secretion of virulence-related proteins by *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, 46,181–185.

**Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015).** Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757–78.

**Shankar, S., Jaiswal, L., & Rhim, J.W. (2016).** Gelatin-based nanocomposite films: Potential use in antimicrobial active packaging. In: **Barros-Velázquez, J.(Ed)** Antimicrobial Food Packaging, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands (pp. 339–348).

**Shiku, Y., Hamaguchi, P.Y., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Tanaka, M. (2004).** Effect of surimi quality on properties of edible films based on Alaska pollack. *Food Chemistry*, 86(4), 493–499.

**Siddhuraju, P., & Becker, K. (2007).** The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) seed extracts. *Food Chemistry*, 101(1), 10- 19.

**Sifuentes-Nieves, I., Rendón-Villalobos, R., Jiménez-Aparicio, A., Camacho-Díaz, B.H., Gutiérrez López, G.F. & Solorza-Feria, J. (2015).** Physical, Physicochemical, Mechanical, and Structural Characterization of Films Based on Gelatin /Glycerol and Carbon Nanotubes. *International Journal of Polymer Science*, 2015, 1–8.

**Singh, N., & Ragini, P. (2004).** Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. *Food Chemistry* , 85, 611–616.

**Singleton, V.L., & Rossi, J.R. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphothungstic acid. *American Journal of Enology and Viticulture*,16 ,144–158.

**Siripatrawan, U., & Harte, B.R. (2010).** Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24, 770–775.

**Soares, N.D.F.F. (2009).** Chitosan properties and application. In: **Long, Y. (Ed.)**, Biodegradable Polymer Blends and Composites from Renewable Resources. Wiley, New York.

**Sohaib, M., Anjum, F.M., Arshad, M.S., & Rahman, U.U. (2016).** Postharvest intervention technologies for safety enhancement of meat and meat based products; a critical review. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 53(1), 19-30.

**Sorrentino, E., Succi, M., Tipaldi, L., Pannella, G., Maiuro, L., Sturchio, M., & Tremonte, P. (2018).** Antimicrobial activity of gallic acid against food-related *Pseudomonas* strains and its use as biocontrol tool to improve the shelf life of fresh black truffles. *International Journal of Food Microbiology*, 266, 183–189.

**Soufleros, E., Mygdalia, S., & Natskoulis, P. (2005).** Production process and characterization of the traditional Greek fruit distillate “Koumaro” by aromatic and mineral composition. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 699–716.

**Sulusoglu, M., Cavusoglu, A., & Erkal, S. (2011).** *Arbutus unedo* L. (Strawberry tree) selection in Turkey Samanli mountain locations. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 3545-3551.

**Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., & Bigger, S.W. (2003).** Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its application. *Journal of Food Science*, 68, 408–420.

-T-

**Takrouni, M.M., & Boussaid.M. (2010).** Genetic diversity and population's structure in Tunisian strawberry tree (*Arbutus unedo* L.). *Scientia Horticulturae*, 126, 330–337.

**Takwa, S., Caleja, C., Barreira, J.C.M., Sokovic, M., Achour, L., Barros, L., & Ferreira I.C.F.R. (2018).** *Arbutus unedo* L. and *Ocimum basilicum* L. as sources of natural preservatives for food industry: A case study using loaf bread. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 88, 47–55.

**Tammineni, N., Rasco, B., Powers, J., Nindo, C., & Ünlü, G. (2014).** Bovine and fish gelatin coatings incorporating tannins: Effect on physical properties and oxidative stability of salmon fillets. *Journal of Food Chemistry and Nutrition*, 02, 93–102.

**Tang, C., Xie, B. & Sun, Z. (2017).** Antibacterial activity and mechanism of B-type oligomeric procyanidins from lotus seedpod on enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Functional Foods*, 38, 454–463.

**Tavares, L., Fortalezas, S., Carrilho, C., McDougall, G.J., Stewart, D., & Ferreira, R.B. (2010).** Antioxidant and antiproliferative properties of strawberry tree tissues. *Journal of Berry Research*, 1(1), 3-12.

**Tenuta, M.C., Tundis, R., Xiao, J., Loizzo, M.R., Dugay, A., & Deguin, B. (2018).** *Arbutus* species (Ericaceae) as source of valuable bioactive products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2018, 1–18.

**Thomazine, M., Carvalho, R., & Sobral, P. (2005).** Physical properties of gelatin films plasticized by blends of glycerol and sorbitol. *Journal of Food Science*, 70, 172–176.

**Tonelli, N., & Gallouin, F. (2013).** Des fruits et des grains comestibles du monde entier. Ed : Brigitte Peyrot, Lavoisier SAS. Paris (pp. 87 -91).

**Torres, J.A., Valle, F., Pinto, C., Garcia-Fuentes, A., Salazar, C., & Cano, E. (2002).** *Arbutus unedo* L. communities in southern Iberian Peninsula Mountains. *Plant Ecology*, 160, 207–223.

**Tromp, J. (1990).** Fruit shape in apple under various controlled environment conditions. *Scientia Horticulturae*, 43, 109–115.

**Trumbo, P., Schlicker, S., Yates, A.A., & Poos, M. (2002).** Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids. *Journal of American Diet Association*, 102, 1621-1630.

-U-

**Umaraw, P., Munekata, P.E.S., Verma, A.K., Barba, F.J., Singh, V.P., Kumar, P. & Lorenzo, J.M. (2020).** Edible films/coating with tailored properties for active packaging of meat, fish and derived products. *Trends in Food Science and Technology*, 98, 10- 24.

**UMAZ, A., & UMAZ, K. (2019).** Determination of Fatty Acid Composition of *Arbutus Unedo* L. Fruit, 5<sup>th</sup> International Conference on Engineering & Natural Sciences, VAN, TURKEY (pp. 96-102).

-V-

**Valdés García, A., Juárez Serrano, N., Beltrán Sanahuja, A., & Garrigós, M. C. (2020).** Novel Antioxidant Packaging Films Based on Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) and Almond Skin Extract: Development and Effect on the Oxidative Stability of Fried Almonds. *Antioxidants*, 9(7), 629.

**Vásconez, M. B., Flores, S. K., Campos, C. A., Alvarado, J., & Gerschenson, L. N. (2009).** Antimicrobial activity and physical properties of chitosan–tapioca starch based edible films and coatings. *Food Research International*, 42(7), 762–769.

**Vicente, A.R., Manganaris, G.A., Sozzi, G.O., & Crisosto, C.H. (2009).** Nutritional quality of fruits and vegetables. In: **Florokowski, W.J., Shewfelt, R.L., Brueckner, B., & Prusia, S.E. (Eds.).** Postharvest Handling: A Systems Approach. Academic Press, San Diego, CA (pp. 57–106).

**Vidrih, R., Hribar, J., Prgomet, Ž., & Ulrich, N.P. (2013).** The physico-chemical properties of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 5, 29–33.

**Vitale, D. (2012).** La macchia a corbezzolo (*Arbutus unedo* L., *Ericaceae*): aspetti botanici, prodotti e potenzialità economiche in Sardegna Tesi di dottorato di ricerca. In: Monitoraggio e Controllo degli Ecosistemi Forestali in Ambiente Mediterraneo. Università degli Studi di Sassari (pp.73).

-W-

**Wu, J., Chen, S., Ge, S., Miao, J., Li, J., & Zhang, Q. (2013).** Preparation, properties and antioxidant activity of an active film from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 32(1), 42–51.

-X-

**Xu, C. C., Wang, B., Pu, Y. Q., Tao, J. S., & Zhang, T. (2017).** Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 15(10), 721–731.

-Y-

**Yakimes, I., Wellner, N., Smith, A. C., Wilson, R. H., Farhat, I., & Mitchell, J. (2005).** Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state. *Polymer*, 46, 12577-12585.

**Yangilar, F. (2013).** The Application of Dietary Fibre in Food Industry: Structural Features, Effects on Health and Definition, Obtaining and Analysis of Dietary Fibre: A Review. *Journal of Food and Nutrition Research*, 1(3), 13-23.

**Yazgan, H., Ozogul, Y., & Boga, E.K. (2019).** Antimicrobial influence of nanoemulsified lemon essential oil and pure lemon essential oil on food-borne pathogens and fish spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 306, 108266.

**Yen, G., Hsieh, P.(1995).** Antioxidative activity and scavenging effects on active oxygen of xylose-lysine Maillard reaction products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67, 415–420.

**Yildirim, S. (2011).** Active packaging for food biopreservation. Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition (pp. 460-489).

**Yildirim, S., & Röcker, B. (2018).** Active Packaging. In: Angelo, M., Cerqueira, P. R., Lagaron, J.M., Miguel, L., Castro, P., Martins, A.A., de Oliveira S.V. Nanomaterials for Food Packaging: Materials, Processing Technologies, and Safety Issues. Elsevier Science (pp.173–202).

**Yildirim, S., Röcker, B., Pettersen, M.K., Nilsen-Nygaard, J., Ayhan, Z., Rutkaite, R., Radusin, T., Suminska, P., Marcos, B., & Coma, V. (2018).** Active packaging applications for food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17, 165–199.

**-Z-**

**Zhao, Y., Chen, M., Zhao, Z., & Yu, S. (2015).** The antibiotic activity and mechanisms of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) bagasse extract against food-borne pathogens. *Food Chemistry*, 185, 112–118.

**Zhao, Y., Li, Z., Yang, W., Xue, C., Wang, Y., Dong, J., & Xue, Y. (2016).** Modification of gelatin with *Galla chinensis* extract, a natural crosslinker. *International Journal of Food Properties*, 19, 731–744.

**Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming W. (1999).** The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555–559

**Zhu, Y., Chu, J., Lu, Z., Lv, F., Bie, X., Zhang, C., & Zhao, H. (2018).** Physicochemical and functional properties of dietary fiber from foxtail millet (*Setaria italic*) bran. *Journal of Cereal Science*, 79, 456–461.

**Zlatanov, S., & Laskaridis, K. (2007).** Seasonal variation in the fatty acid composition of three Mediterranean fish –sardine (*Sardina pilchardus*), anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and picarel (*Spicara smaris*). *Food Chemistry*, 103, 725–728.

# **Annexes**

Annexe I : Courbes d'étalonnage

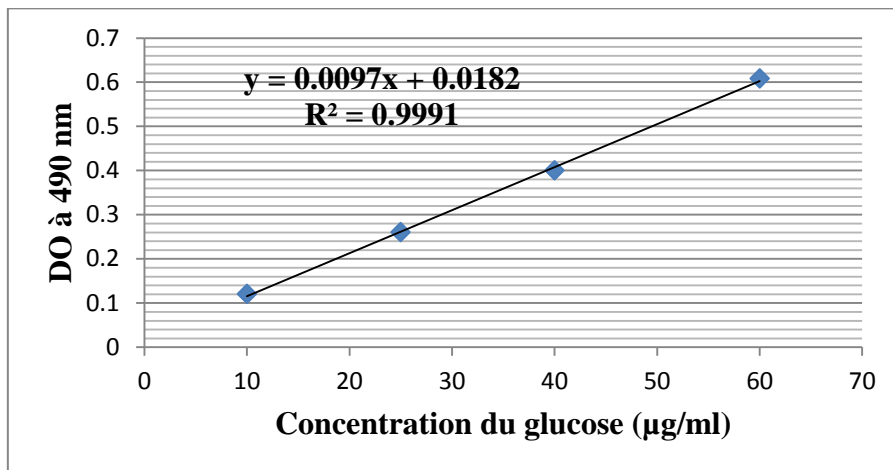


Figure 1. Courbe d'étalonnage du glucose.

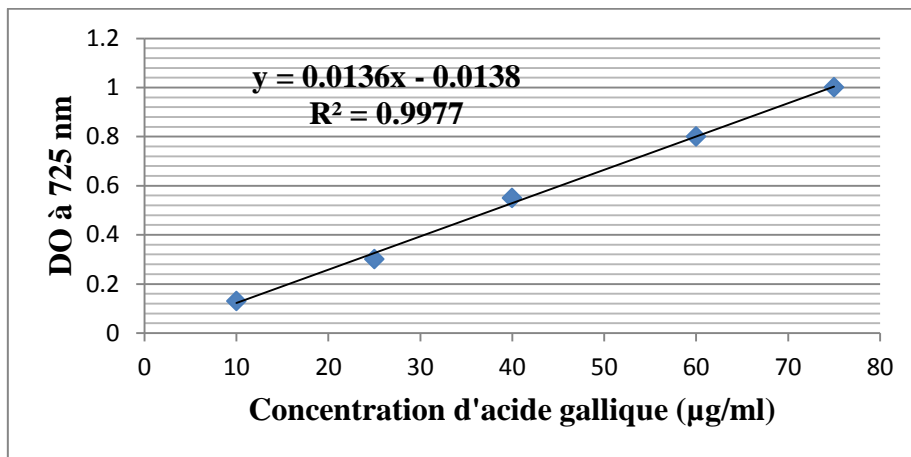


Figure 2. Courbe d'étalonnage d'acide gallique.

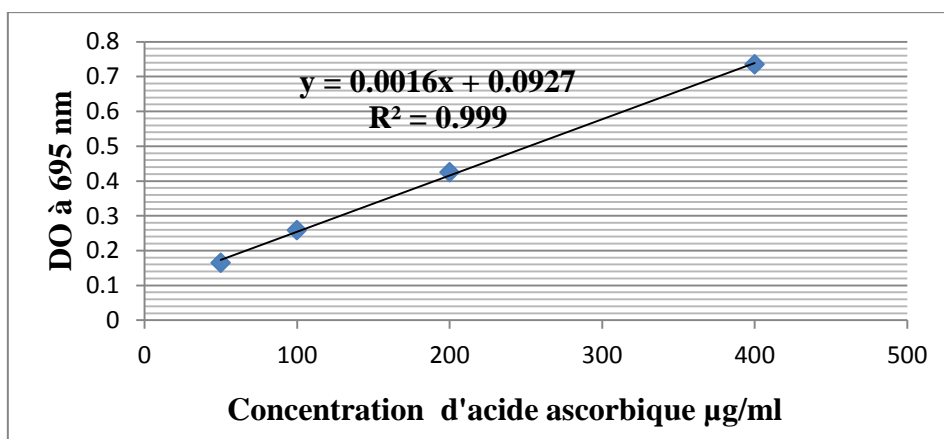


Figure 3. Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique



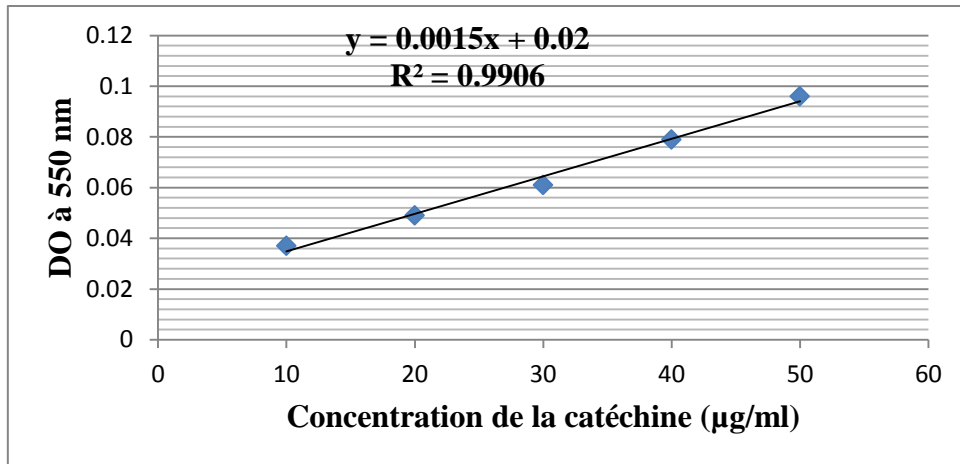


Figure 4. Courbe d'étalonnage de la catéchine.

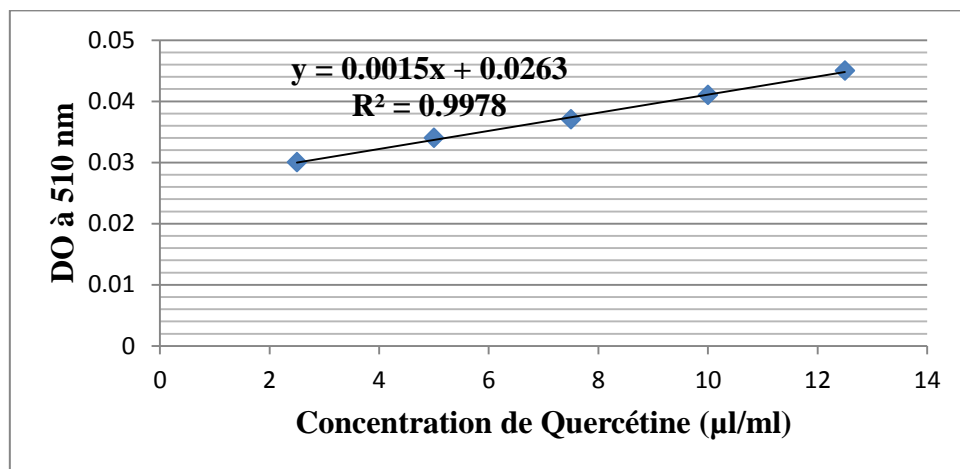


Figure 5. Courbe d'étalonnage de la quercétine.

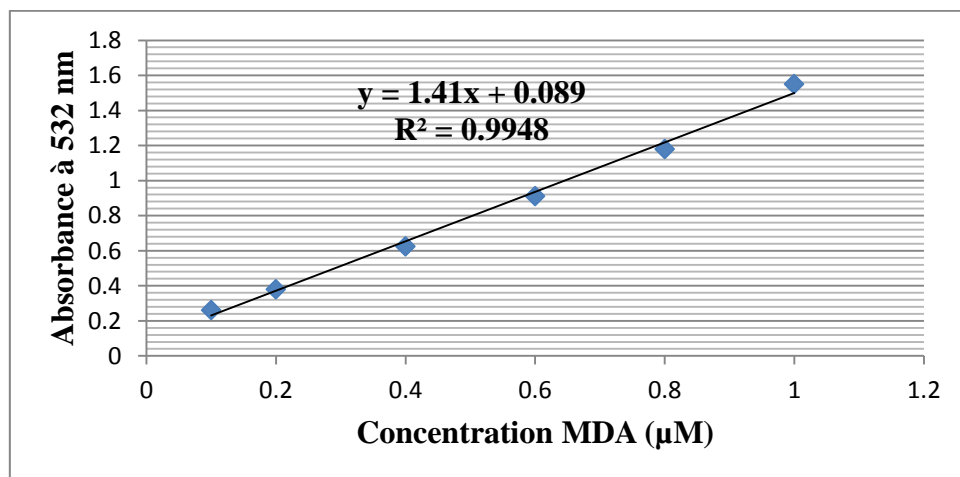


Figure 6. Courbe d'étalonnage de malondialdehyde (MDA).

Annexe II : Régressions linéaires pour la détermination des EC50

1. CAT

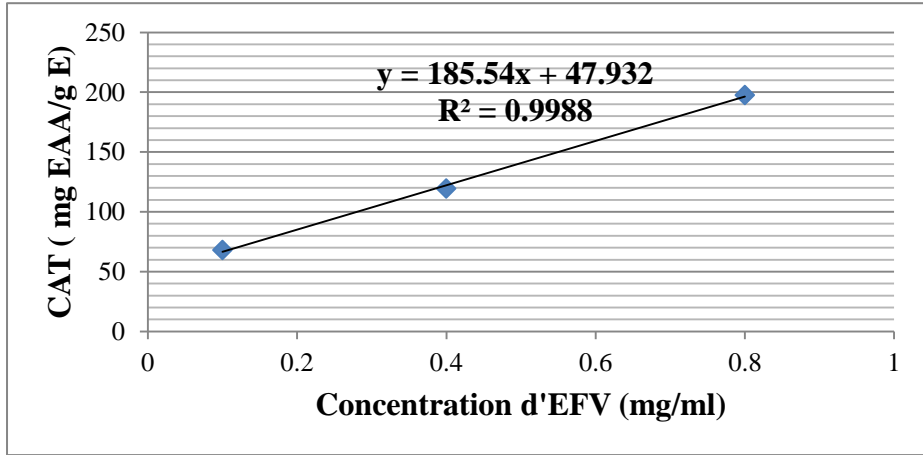


Figure 1. Régression linéaire pour l'EFV

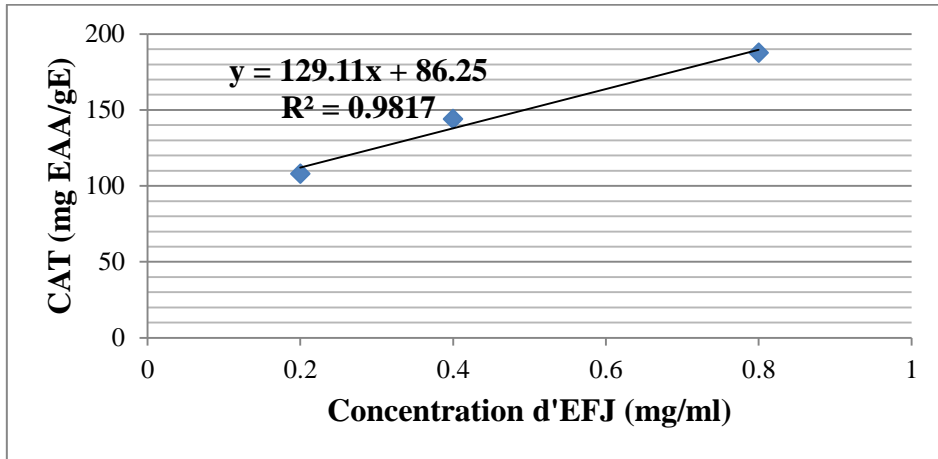


Figure 2. Régression linéaire pour l'EFJ

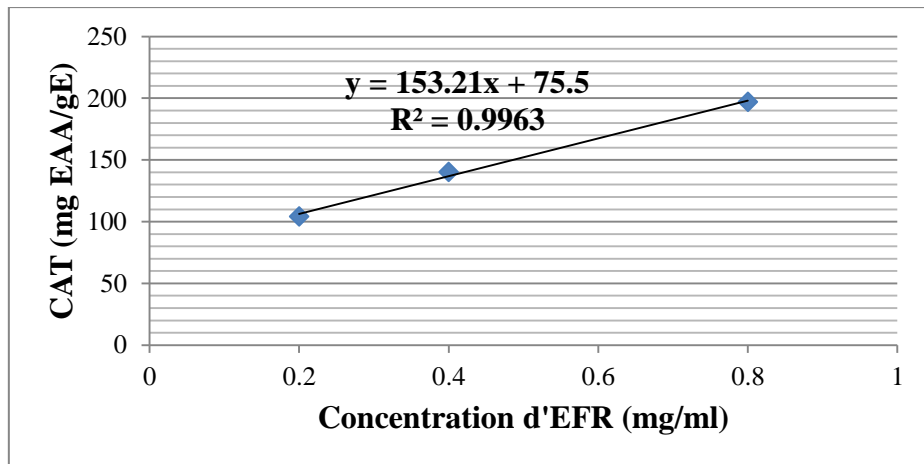


Figure 3. Régression linéaire pour l'EFR

2. FRAP

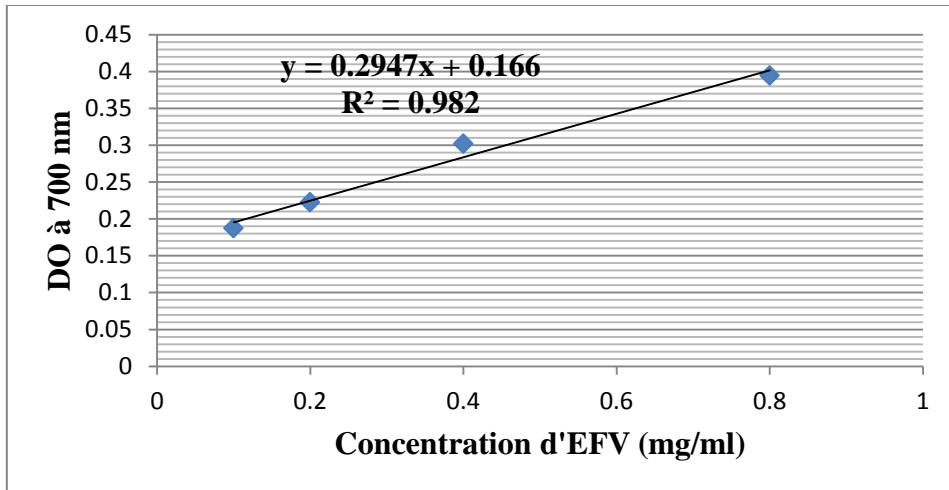


Figure 4. Régression linéaire pour l'EFV.

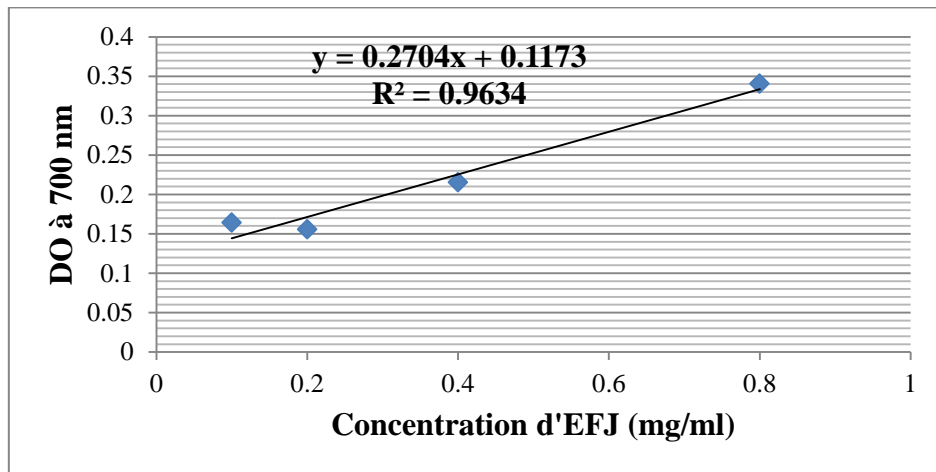


Figure 5. Régression linéaire pour l'EFJ.

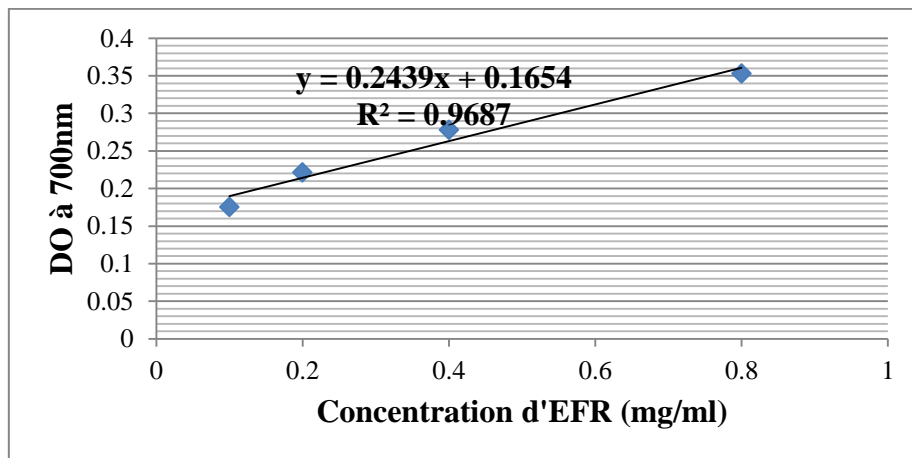


Figure 6. Régression linéaire pour l'EFR.

3. Piégeage du radical libre DPPH<sup>•</sup>

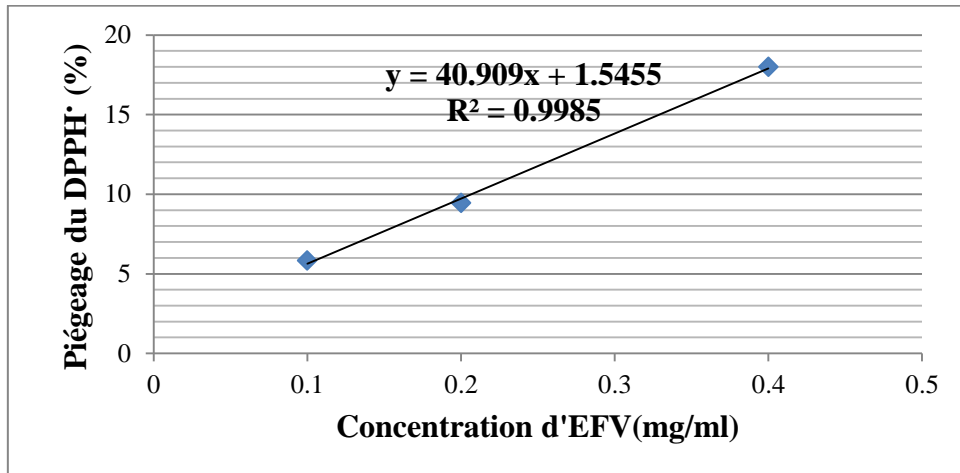


Figure 7. Régression linéaire pour l'EFV

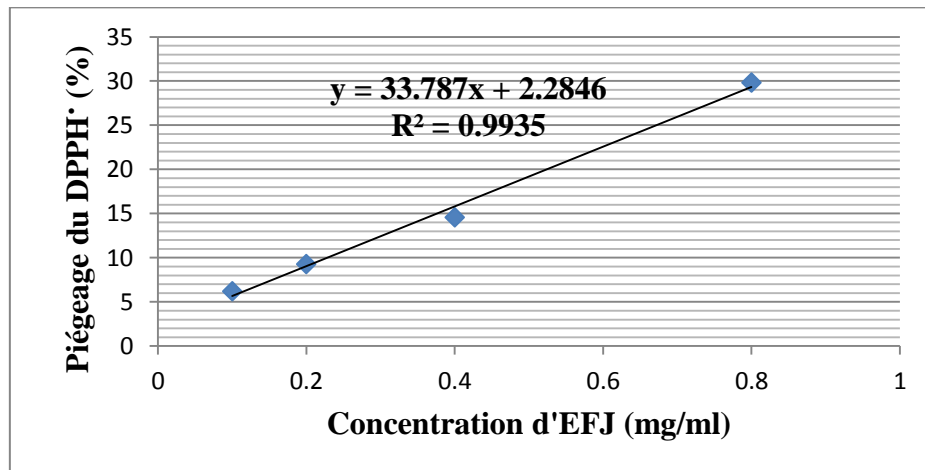


Figure 8. Régression linéaire pour l'EFJ

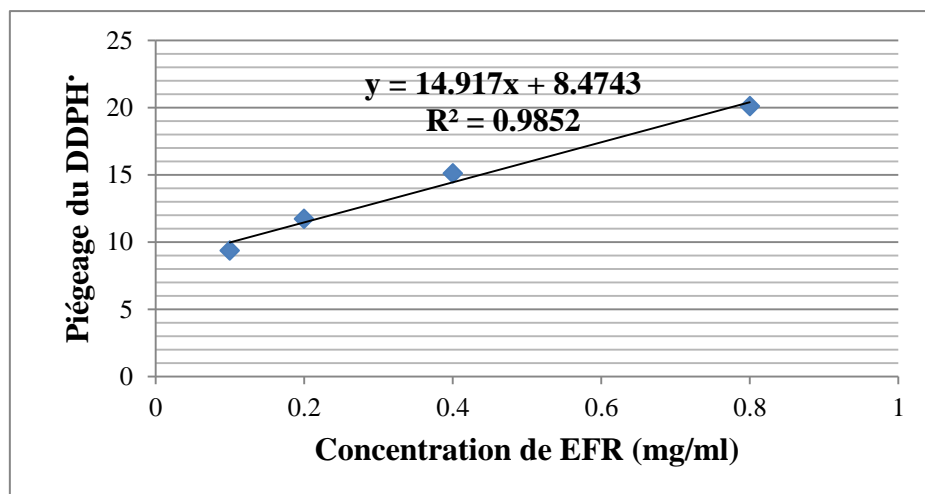


Figure 9. Régression linéaire pour l'EFR

4. Inhibition du radical ABTS<sup>+</sup>

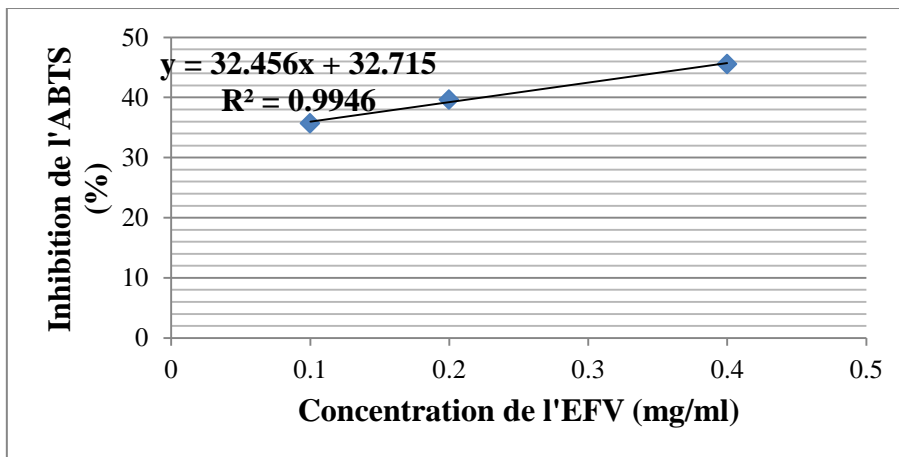


Figure 10. Régression linéaire pour l'EFV.

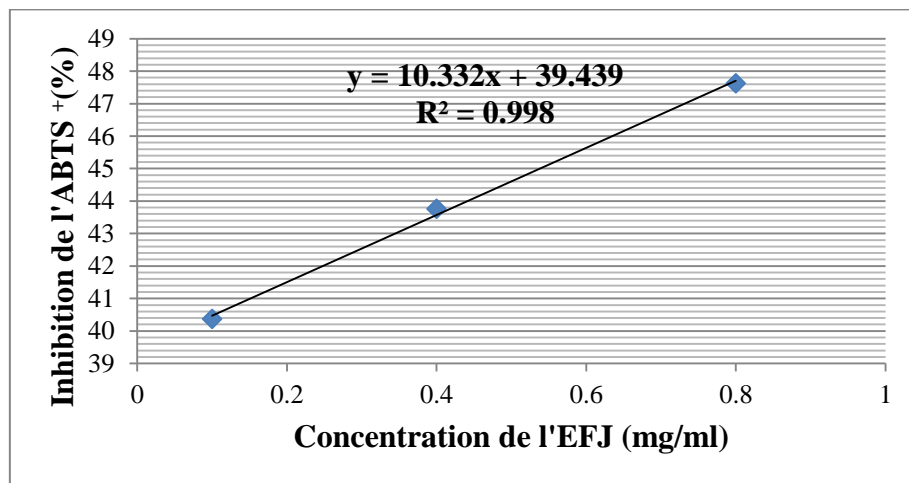


Figure 11. Régression linéaire pour l'EFJ

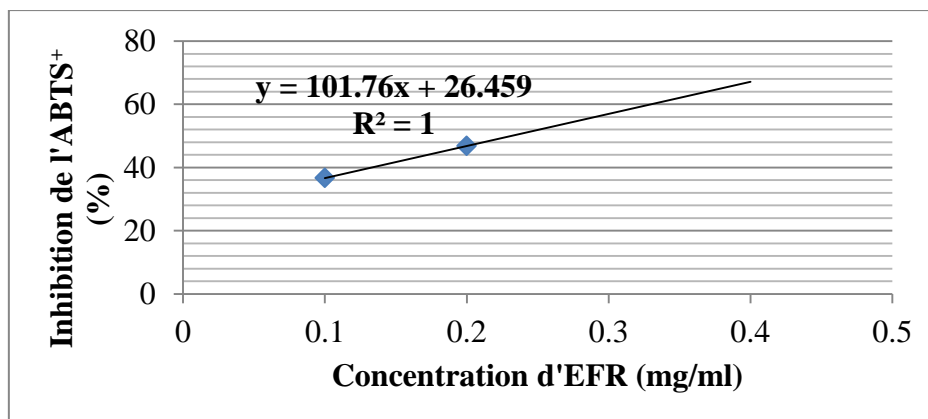


Figure 12. Régression linéaire pour l'EFR.

5. Piégeage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

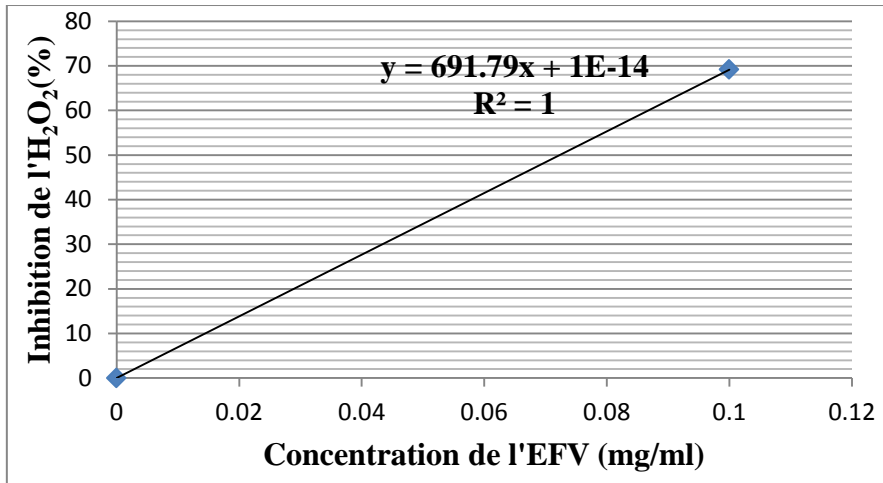


Figure 13. Régression linéaire pour l'EFV.

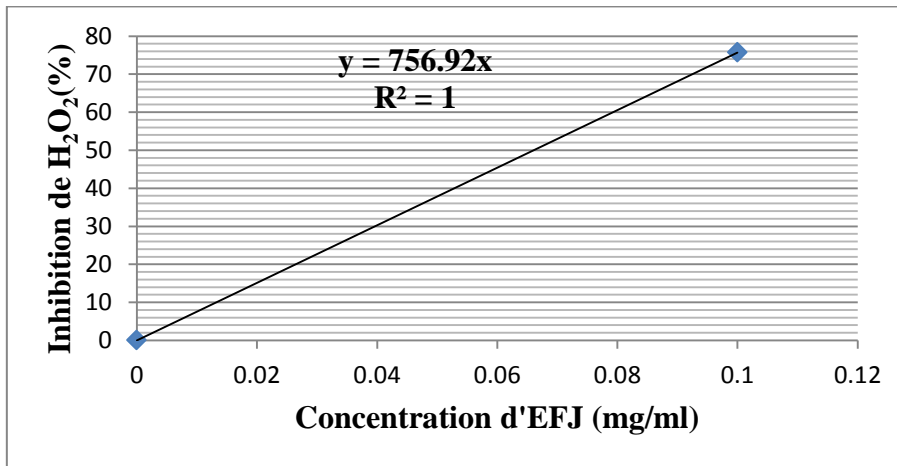


Figure 14. Régression linéaire pour l'EFJ.

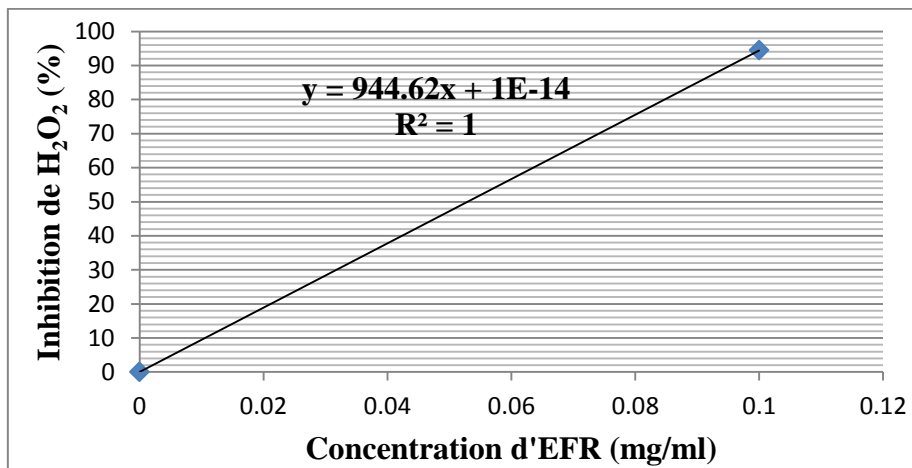


Figure 15. Régression linéaire pour l'EFR.

### Annexe III : Résultat de la détermination des activités antioxydantes des EFA

#### 1. CAT

**Tableau 1.** Valeurs de la CAT (mg EAA/ gE) des EFA à différentes concentrations

Extrait	Concentration (mg/ml)				
	0	0,1	0,2	0,4	0,8
<b>EFV</b>	0±0,00	68,00 ± 0,00	79,50 ± 1,50	119,50 ± 1,50	197,50 ± 5,50
<b>EFJ</b>	0±0,00	55,00 ± 4,00	108,00 ± 1,00	144,00 ± 2,00	187,50 ± 4,50
<b>EFR</b>	0±0,00	65,00 ± 5,00	104,00 ± 2,00	140,00 ± 3,00	197,00 ± 4,00

<sup>(EFV)</sup> Extrait de fruit vert, <sup>(EFJ)</sup> Extrait de fruit jaune, <sup>(EFR)</sup> extrait de fruit rouge

#### 2. FRAP

**Tableau 2.** Absorbances à 700 nm des EFA à différentes concentrations.

Extrait	Concentration (mg/ml)				
	0	0,1	0,2	0,4	0,8
<b>EFV</b>	0±0,00	0,187±0,008	0,222±0,005	0,302± 0,012	0,394±0,004
<b>EFJ</b>	0±0,00	0,164±0,005	0,155±0,010	0,215±0,00	0,340±0,006
<b>EFR</b>	0±0,00	0,175±0,005	0,221±0,002	0,278±0,008	0,347±0,006
<b>AA</b>	0±0,00	0,13±0,005	0,263±0,002	0,56±0,00	1,094±0,004

<sup>(EFV)</sup> Extrait de fruit vert, <sup>(EFJ)</sup> Extrait de fruit jaune, <sup>(EFR)</sup> extrait de fruit rouge, <sup>(AA)</sup> Acide ascorbique

#### 3. Piégeage du radical DPPH<sup>•</sup>

**Tableau 3.** Valeur de piégeage de DPPH (%) des EFA à différentes concentrations.

Extrait	Concentration (mg/ml)				
	0	0,1	0,2	0,4	0,8
<b>EFV</b>	0±0,00	8,81± 3,00	9,39±0,10	20,81± 2,81	28,18±1,63
<b>EFJ</b>	0±0,00	4,27± 1,90	12,27±3,00	12,90±1,63	25,72±4,09
<b>EFR</b>	0±0,00	9,36± 3,27	11,72± 0,09	15,09±1,18	20,09±0,09
<b>AA</b>	0±0,00	64,00±0,36	70,18±0,72	75,39±0,45	83,09±0,72

<sup>(EFV)</sup> Extrait de fruit vert, <sup>(EFJ)</sup> Extrait de fruit jaune, <sup>(EFR)</sup> extrait de fruit rouge, <sup>(AA)</sup> Acide ascorbique

#### 4. Inhibition du radical ABTS<sup>+</sup>

**Tableau 4.** Valeur de l'inhibition de l'ABTS<sup>+</sup> (%) des EFA à différentes concentrations.

Extrait	Concentration (mg/ml)				
	0	0,1	0,2	0,4	0,8
<b>EFV</b>	0±0,00	35,68±0,54	39,62±0,40	41,58±0,20	46,26±0,00
<b>EFJ</b>	0±0,00	40,36±0,06	42,26±0,33	43,75±0,47	47,62±0,67
<b>EFR</b>	0±0,00	36,63±0,94	46,81±0,00	48,98±0,40	52,84±0,74
<b>T</b>	0±0,00	51,42±0,27	55,08±0,13	64,85±0,40	87,51±0,26

<sup>(EFV)</sup> Extrait de fruit vert, <sup>(EFJ)</sup> Extrait de fruit jaune, <sup>(EFR)</sup> extrait de fruit rouge, <sup>(T)</sup> Trolox

**5. Piégeage de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

**Tableau 5.** Valeur de piégeage de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(%) des EFA à différentes concentrations.

Extrait	Concentration (mg/ml)				
	0	0,1	0,2	0,4	0,8
<b>EFV</b>	0±0,00	69,35±0,29	81,17±0,25	84,82±0,43	91,48±0,14
<b>EFJ</b>	0±0,00	75,64±0,07	79,07±0,21	85,79±0,07	86,92±0,36
<b>EFR</b>	0±0,00	94,66±0,29	96,76±0,21	98,76±0,29	99,43±0,07
<b>AA</b>	0±0,00	81,43±0,14	85,48±0,21	86,46±0,21	88,20±2,17

<sup>(EFV)</sup> Extrait de fruit vert, <sup>(EFJ)</sup> Extrait de fruit jaune, <sup>(EFR)</sup> extrait de fruit rouge, <sup>(AA)</sup> Acide ascorbique



**Annexe IV : Résultat de l'étude de l'effet du film sur l'oxydation du beurre**

**1. Acidité**

**Tableau 1.** Evolution de l'acidité (%) du beurre au cours du stockage réfrigéré.

Échantillons	Temps (Jours)						
	1	4	7	11	14	18	21
<b>TN</b>	0,11±0,03	7,00±0,5	1,92±0,01	0,94±0,04	0,94±0,07	0,70±0,06	0,35±0,01
<b>EFA</b>	0,11±0,03	1,17±0,02	1,17±0,05	0,47±0,03	0,23±0,03	1,17±0,05	0,23±0,03
<b>FA</b>	0,11±0,03	0,47±0,01	0,70±0,01	0,70±0,02	0,47±0,01	0,47±0,05	0,23±0,04
<b>FT</b>	0,11±0,03	3,52±0,4	8,69±0,08	0,94±0,05	0,23±0,04	0,70±0,03	0,58±0,02

<sup>(TN)</sup> témoin négatif, <sup>(EFR)</sup> extrait de fruit rouge, <sup>(FA)</sup> film à tester, <sup>(FT)</sup> film témoin.

**2. Teneur en peroxyde (PV)**

**Tableau 2.** Evolution de la PV (meq O<sub>2</sub>/Kg) du beurre au cours du stockage réfrigéré.

Échantillons	Temps (Jours)					
	1	4	8	12	16	21
<b>TN</b>	1,17±0,010	0,3±0,01	0,35±0,03	0,32±0,008	0,4±0,03	0,42±0,01
<b>EFA</b>	1,17±0,010	0,25±0,03	0,20±0,00	0,25±0,04	0,27±0,02	0,25±0,002
<b>FA</b>	1,17±0,010	0,16±0,04	0,19±0,02	0,25±0,01	0,26±0,01	0,23±0,03
<b>FT</b>	1,17±0,010	0,2±0,02	0,31±0,009	0,29±0,03	0,37±0,01	0,40±0,01

<sup>(TN)</sup> témoin négatif, <sup>(EFR)</sup> extrait de fruit rouge, <sup>(FA)</sup> film à tester, <sup>(FT)</sup> film témoin.

**3. Indice TBARS**

**Tableau 3.** Evolution de l'indice TBARS (mg MDA/Kg) du beurre au cours du stockage réfrigéré.

Échantillons	Temps (Jours)					
	1	4	8	12	16	21
<b>TN</b>	0,002± 0,01	0,01± 0,02	0,04± 0,01	0,17± 0,02	0,17± 0,03	0,61±0,01
<b>EFA</b>	0,002± 0,01	0,09± 0,03	0,18± 0,04	0,16± 0,02	0,17± 0,02	0,18± 0,03
<b>FA</b>	0,002± 0,01	0,05± 0,01	0,06± 0,02	0,12± 0,005	0,19± 0,01	0,12± 0,07
<b>FT</b>	0,002± 0,01	0,03± 0,01	0,05± 0,01	0,11± 0,006	0,23± 0,007	0,22± 0,03

<sup>(TN)</sup> témoin négatif, <sup>(EFR)</sup> extrait de fruit rouge, <sup>(FA)</sup> film à tester, <sup>(FT)</sup> film témoin.

**Annexe V : Résultat de l'étude de l'effet antimicrobien du film et conservation de la sardine**

**1. Évaluation du pH de la sardine pendant le stockage**

**Tableau 1.** Evolution du pH des sardines inoculées par *S. aureus* pendant la conservation.

Echantillons	Temps (Jours)			
	1	5	8	12
FA	6,51± 0,00	6,67± 0,11	7,21± 0,15	8,30± 0,13
FT	6,51± 0,00	7,49± 0,02	7,77± 0,07	8,14± 0,11
TN	6,51± 0,00	7,17± 0,07	7,76± 0,04	8,34± 0,05
EFR	6,51± 0,00	6,81± 0,03	7,28± 0,06	8,35± 0,05

**Tableau 2.** Evolution du pH des sardines inoculées par *L. monocytogenes* pendant la conservation.

Echantillons	Temps (Jours)			
	1	5	8	12
FA	6,10± 0,01	6,20± 0,02	6,85± 0,05	7,05± 0,01
FT	6,10± 0,03	6,15± 0,03	6,60± 0,02	6,90± 0,02
TN	6,35± 0,01	6,45± 0,03	7,40± 0,04	8,45± 0,05
EFR	6,25± 0,00	6,30± 0,04	7,70± 0,06	8,30± 0,02

**Tableau 3.** Evolution du pH des sardines inoculées par *P. aeruginosa* pendant la conservation.

Echantillons	Temps (Jours)			
	1	5	8	12
FA	6,30± 0,03	6,31± 0,01	6,40± 0,01	7,50± 0,01
FT	6,30± 0,00	6,36± 0,02	6,95± 0,06	7,60± 0,02
TN	6,33± 0,02	6,40± 0,03	7,20± 0,03	7,95± 0,00
EFR	6,35± 0,00	6,37± 0,03	7,10± 0,05	7,70± 0,04

**2. Activité antibactérienne du film**

**Tableau 4.** Evolution du nombre de *S. aureus* (Log<sub>10</sub>UFC/g) pendant la conservation

Echantillons	Temps (Jours)			
	1	5	8	12
FA	5,00±0,10	3,95±0,21	3,00±0,45	1,00±0,09
FT	5,00±0,10	4,98±0,13	4,46±0,07	3,00±0,13
TN	5,00±0,10	5,08±0,30	5,15±0,16	5,20±0,18
EFR	5,00±0,10	4,42±0,05	4,14±0,10	2,60±0,07

**Tableau 5.** Evolution du nombre de *L. monocytogenes* (Log<sub>10</sub>UFC/g) pendant la conservation.

<b>Echantillons</b>	<b>Temps (Jours)</b>			
	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>12</b>
<b>FA</b>	5,00±0,10	5,69±0,06	5,32±0,02	4,48±0,06
<b>FT</b>	5,00±0,10	5,65±0,05	5,77±0,12	5,90±0,11
<b>TN</b>	5,00±0,10	5,83±0,10	5,94±0,06	5,98±0,10
<b>EFR</b>	5,00±0,10	5,76±0,08	5,63±0,09	4,85±0,04

**Tableau 6.** Evolution du nombre de *P. aeruginosa* (Log<sub>10</sub>UFC/g) pendant la conservation.

<b>Echantillons</b>	<b>Temps (Jours)</b>			
	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>12</b>
<b>FA</b>	5,00±0,10	5,63±0,11	5,32±0,09	5,00±0,05
<b>FT</b>	5,00±0,10	5,41±0,05	5,75±0,10	5,94±0,01
<b>TN</b>	5,00±0,10	5,53±0,07	5,83±0,06	5,98±0,11
<b>EFR</b>	5,00±0,10	5,46±0,09	5,63±0,04	4,84±0,12

**Résumé :**

L'ensemble de notre travail a été conduit sur le fruit d'*Arbutus unedo* L. (*A. unedo*). Les résultats ont montré que le fruit mature contient la plus haute teneur en sucre ( $20,14 \pm 0,28$  g/100g) et en protéines ( $6,51 \pm 0,19$  g/ 100g), il est le plus acide aussi ( $0,74 \pm 0,02$  %).

L'extrait de fruit rouge (EFR) est le plus riche en phénols totaux ( $72,93 \pm 0,36$  mg EAG /g E) et en flavonoïdes ( $29,12 \pm 0,69$  mg EQ/ g E). L'analyse de l'EFR par HPLC-DAD a révélé l'abondance de la procyanidine B2 et de l'acide gallique. Le même extrait a montré la meilleure activité antioxydante. Par ailleurs, tous les extraits ont montré un effet bactéricide.

L'addition de l'EFR à la gélatine confère au film une faible perméabilité à la vapeur d'eau et une meilleure activité antioxydante par rapport au témoin. De plus, après l'analyse par FTIR, il apparaît que cet extrait peut affecter la structure hélicoïdale de la gélatine et améliorer la structure de gel. Le film d'emballage était efficace pour la bioconservation du beurre et de la sardine.

**Mots clés :** *Arbutus unedo* L., activité antioxydante, activité antimicrobienne, film actif, bioconservation.

**Abstract :**

All of our work has been carried out on *Arbutus unedo* L. fruit (*A. unedo*). The results showed that the mature fruit contains the highest content of sugar ( $20.14 \pm 0.28$  g/100g), protein ( $6.51 \pm 0.19$  g/ 100g), and acidity ( $0.74 \pm 0.02$  %).

Red fruit extract (RFE) is the richest in total phenols ( $72.93 \pm 0.36$  mg GAE/gE) and flavonoids ( $29.12 \pm 0.69$  mg QE/gE). Analysis of the RFE by HPLC-DAD revealed the abundance of procyanidin B2 and gallic acid. The same extract showed the best antioxidant activity. Furthermore, all the extracts showed a bactericidal effect.

The addition of the RFE to the gelatin gives the film low water vapor permeability and better antioxidant activity than the control film. In addition, after analysis by FTIR, it appears that this extract can affect the helical structure of gelatin and improve the gel structure. The wrapping film was effective for the biopreservation of butter and sardines.

**Key words:** *Arbutus unedo* L., antioxidant activity, antimicrobial activity, active film, biopreservation.

**المخلص:**

تم تنفيذ جميع أعمالنا على فاكهة اللنج (*A. unedo*). أظهرت النتائج أن الفاكهة الناضجة تحتوي على أعلى نسبة من السكر ( $20,14 \pm 0,28$  g/100g)، البروتين ( $6,51 \pm 0,19$  g/ 100g) و الحموضة ( $0,74 \pm 0,02$  %). مستخلص الفاكهة الحمراء هو الأغنى من حيث إجمالي الفينولات ( $72,93 \pm 0,36$  mg EAG/gE) والفلافونويدات ( $29,12 \pm 0,69$  mg EQ/gE). كشف تحليل EFR بواسطة HPLC-DAD عن وفرة بروسانييد B2 وحمض الغاليك. أظهر المستخلص نفسه أفضل نشاط مضاد للأكسدة. علاوة على ذلك، أظهرت جميع المستخلصات تأثير مبيد للبكتيريا. إضافة EFR إلى الجيلاتين يعطي الغلاف نفاذية منخفضة لبخار الماء و نشاط مضاد للأكسدة أفضل بالمقارنة مع الغلاف الشاهد. بالإضافة إلى ذلك، بعد التحليل بواسطة FTIR، يبدو أن هذا المستخلص يمكن أن يؤثر على التركيب الحلزوني للجيلاتين ويحسن بنية الهلام. من جهة أخرى الغلاف أثبت فعالية في الحفظ البيولوجي للزبدة والسردين.

**الكلمات الدلالية :** *Arbutus unedo* L.، اللنج، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للميكروبات، الغلاف النشط، الحفظ البيولوجي.