

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique**  
**Université MENTOURI - Constantine**  
**Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires**  
**I.N.A.T.A.A.**  
**Département de Technologie Alimentaire**

N° d'ordre :

N° de série :

## **Mémoire**

**Présenté pour l'obtention du diplôme de Magister en Sciences Alimentaires**

**Option : Technologie Alimentaire**

---

**Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Citrus limon* : application à la margarine**

---

Présenté par :

**M<sup>lle</sup> HIMED Louiza**

**Soutenu le :14 juin 2011**

**Devant le jury composé de :**

- |                               |            |                                  |
|-------------------------------|------------|----------------------------------|
| - Président : Pr. AGLI A.     | Professeur | Université Mentouri, Constantine |
| - Encadreur : Dr. BARKAT M.   | M.C.       | Université Mentouri, Constantine |
| - Examineurs : - Dr. ARHAB R. | M.C.       | Université, Tebessa              |
| - D r. BOUDJELLAL A.          | M.C.       | Université Mentouri, Constantine |

**Année universitaire 2010/2011**

## *Remerciement*

*Je tiens à remercier avant tous Allah le tout puissant qui m'a donné la santé, le courage, la volonté et la patience de réaliser ce travail*

*Un remerciement exceptionnel à mes **parents** et à toute ma famille pour leur soutien, leur présence et leurs encouragements ainsi qu'à toute la famille **SABOUNI***

***A mon enseignant et président du jury, M. AGLI A.***

*Je suis comblée de l'immense honneur que vous me faites en acceptant de présider le jury de ma thèse, Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères reconnaissances.*

***Nos remerciements les plus sincères à M. BOUDJELLAL A.***

*Directeur et enseignant à l'institut de l'INATAA pour avoir accepté de juger ce travail.*

***Des remerciements spéciaux pour M ARHAB R.***

*Je tiens à vous remercier d'avoir accepté de se déplacer pour juger ce travail*

***A mon exemple M<sup>me</sup> BARKAT***

*J'ai été satisfaite de vos qualités exceptionnelles. Votre simplicité et votre amour du travail bien fait font de vous une enseignante admirable dont l'exemple à suivre.*

*Recevez ici madame mes sentiments de respect et de gratitude.*

*Un grand remerciement pour **M. NAMOUNE H.** Directeur de la thèse  
Je tiens à vous remercier de m'avoir donné la chance pour poursuivre mes études*

*Un remerciement à **M. AZZOUC** et **M. OUZANI** de laboratoire de recherche et de développement de la margarinerie de **Cévitaf** ainsi que tout le personnel de l'unité.*

*Un grand merci pour Sawsen, Salíha, Farída, Hayat, Ahlem, Loubna, Adél, Loucif, Lyamine, Anís, et à tous ceux (amis et amies) qui ont contribué de près ou de loin par leurs conseils et leurs encouragements à l'aboutissement de ce travail*

*Un remerciement exceptionnel pour tout le personnel du groupe **Fly** de Sidi-Aich, d'Alger et d'Oran, sans oublier la société **Frey Lau** d'Allemagne*

## SOMMAIRE

Introduction.....	1
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>Chapitre I. MARGARINE.....</b>	<b>3</b>
I- Composition globale .....	3
II- Types de margarines.....	4
III- Schéma général de fabrication.....	4
III-1- Additifs liposolubles.....	5
III-2- Additifs hydrosolubles .....	6
IV- Facteurs de détérioration de la margarine.....	6
<b>Chapitre II. ANTIOXYDANTS ET ACTIVITE ANTIOXYDANTE .....</b>	<b>8</b>
I- Etapes et facteurs favorisant l'oxydation des lipides.....	8
II-Types d'antioxydants.....	11
II-1-Antioxydants synthétiques.....	11
II-2-Antioxydants naturels.....	11
II-3-Antioxydants synergistes .....	11
II-4-Antioxydants primaires.....	12
II-5-Antioxydants secondaires.....	12
III- Toxicité des antioxydants.....	12
IV- Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante.....	13
<b>Chapitre III. HUILES ESSENTIELLES DE <i>Citrus limon</i>.....</b>	<b>14</b>
I- Plante de <i>Citrus limon</i> .....	14
II- Généralités sur les huiles essentielles.....	14
II-1-Rôle physiologique.....	15
II-2-Composition chimique.....	15
II-3- Localisation et lieu de synthèse .....	15
II-4- Procédés d'obtention.....	16
II-4-1-Entraînement à la vapeur d'eau.....	16
II-4-2-Expression des épicarpes de Citrus.....	17
III- Facteurs de variabilité.....	17
III-1-Dénomination botanique et la partie de la plante.....	17
III-2-Cycle végétatif.....	17

III-3-Facteurs extrinsèques.....	17
IV-Toxicité des huiles essentielles.....	18
V- Utilisation des huiles essentielles.....	18

## **MATERIEL ET METHODES**

I-Matériel végétal.....	19
I-1- Récolte du fruit.....	19
I-2- Détermination de taux d'humidité.....	21
II- Huiles essentielles.....	21
II-1- Procédés d'extraction.....	21
II-1-1- Expression à froid.....	21
II-1-2- Hydrodistillation.....	21
II-2- Calcul du rendement.....	22
II-3- Cinétique de l'extraction de l'HE <sub>2</sub> .....	22
II-4- Test de mesure du pouvoir antioxydant .....	23
II-4-1-Test au DPPH° .....	23
II-4-2- Test de blanchissement du β-carotène.....	24
III- Elaboration de la margarine témoin et des margarines à huiles essentielles (HE <sub>1</sub> , HE <sub>2</sub> ).....	25
III- 1- Formulation.....	25
III- 2- Procédé de fabrication.....	26
IV- Caractérisation physico-chimique des margarines.....	27
IV-1- Détermination de la teneur en eau et matières volatiles .....	27
IV-2- Détermination du gras et du non gras .....	27
IV-3- Détermination de la teneur en acides gras par CPG .....	28
IV-4- Détermination du pH .....	29
IV-5- Détermination de l'indice de peroxyde .....	29
IV-6- Détermination du point de fusion .....	30
IV-7- Détermination de taux de solide SFC (Solid Fat Content) .....	31
V- Evaluation de la stabilité oxydative des margarines.....	31
V-1- Test de Rancimat.....	31
V-2- Méthode à l'étuve (test de Schaal).....	33
VI- Métrologie sensorielle .....	33
VII-Analyse statistique .....	34

## RESULTATS ET DISCUSSION

1-Taux d'humidité.....	35
2- Rendement d'extraction en huiles essentielles.....	35
3- Cinétique d'extraction de HE <sub>2</sub> .....	36
4- Activité antioxydante des huiles extraites.....	37
4-1-Effet scavenger du radical DPPH° .....	37
4-2- Cinétique de la réaction de réduction de DPPH° .....	39
4-3-Test de blanchissement du β-carotène.....	39
5- Caractérisation des margarines élaborées .....	42
5-1-Caractéristiques physicochimiques .....	42
5-2- Composition en acides gras des margarines élaborées.....	43
5-3-Analyse de la texture par RMN (SFC).....	45
5-4- Stabilité oxydative de la margarine.....	46
5-4-1- Test de Rancimat .....	46
5-4-2- Test de Schaal.....	48
6- Métrologie sensorielle.....	50
6-1- Analyse sensorielle.....	50
6-2- Analyse hédonique.....	51
Conclusion .....	53
Références bibliographiques.....	55
Annexes	

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Recette de la margarine témoin et des margarines à huiles essentielles de <i>Citrus limon</i> (HE <sub>1</sub> , HE <sub>2</sub> ).....	25
<b>Tableau 2.</b> Concentration efficace (EC50) et puissance antiradicalaire (ARP) des huiles essentielles de <i>Citrus limon</i> (HE1, HE2) et du Tocoblend du test au DPPH°.....	38
<b>Tableau 3.</b> Concentration efficace (EC50) et puissance antiradicalaire (ARP) des huiles essentielles de <i>Citrus limon</i> (HE <sub>1</sub> , HE <sub>2</sub> ) et du Tocoblend du test de blanchissement du $\beta$ -carotène.....	41
<b>Tableau 4.</b> Caractéristiques physico-chimiques des margarines élaborées .....	42
<b>Tableau 5.</b> Composition en acides gras de la margarine à HE <sub>1</sub> .....	43
<b>Tableau 6.</b> Teneurs comparées en différentes classes d'acides gras (en %) de la margarine à huile essentielle de <i>Citrus limon</i> extraite par expression à froid.....	45
<b>Tableau 7.</b> Facteurs de protection (Fp) de Tocoblend et des huiles essentielles de <i>Citrus limon</i> ajoutés aux margarines élaborées.....	48

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Schéma général de fabrication de la margarine (Karleskind, 1992) .....	5
<b>Figure 2.</b> Mécanisme général des réactions d'oxydation des lipides (Alais <i>et al.</i> , 2003) .....	9
<b>Figure 3.</b> Enchaînement des différentes étapes de la partie pratique .....	20
<b>Figure 4.</b> Schéma général d'un hydrodistillateur.....	22
<b>Figure 5.</b> Procédé de la fabrication de la margarine dan la chaine pilote.....	26
<b>Figure 6.</b> Représentation schématique de l'appareillage du test de Rancimat (ISO6886, 2006).....	33
<b>Figure7.</b> Taux d'humidité de zeste du citron.....	35
<b>Figure 8.</b> Rendement en huiles essentielles.....	36
<b>Figure 9.</b> Evolution du rendement en huile essentielle de zeste de citron extraite par hydrodistillation.....	36
<b>Figure 10.</b> Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH° (Molyneux, 2004) .....	37
<b>Figure 11.</b> Variation du pourcentage d'inhibition du DPPH° en fonction des concentrations de l'HE <sub>1</sub> , de l'HE <sub>2</sub> et du Tocoblend.....	37
<b>Figure 12.</b> Cinétique de la réaction de réduction de DPPH° par le Tocoblend et par les huiles essentielles du <i>Citrus limon</i> .....	39
<b>Figure 13.</b> Cinétique de blanchissement du β-carotène à 490 nm en absence et en présence des antioxydants (Tocoblend, HE <sub>1</sub> et HE <sub>2</sub> ).....	40
<b>Figure 14.</b> Activité antioxydante des huiles essentielles de <i>Citrus limon</i> (HE <sub>1</sub> , HE <sub>2</sub> ) et du Tocoblend.....	41
<b>Figure 15.</b> Indice SFC de la margarine témoin et des margarines à huiles essentielles de <i>Citrus limon</i> (HE <sub>1</sub> , HE <sub>2</sub> ).....	45
<b>Figure 16.</b> Courbes de conductivité de la margarine au Tocoblend (A), à l'HE <sub>1</sub> (B) et à l'HE <sub>2</sub> (C).....	47
<b>Figure 17.</b> Variation de l'indice de peroxyde en fonction du temps de stockage, des margarines au Tocoblend, à HE <sub>1</sub> et à HE <sub>2</sub> .....	49
<b>Figure 18 :</b> Résultats de l'évaluation de l'arôme .....	50
<b>Figure 19.</b> Résultats de l'évaluation de la couleur .....	50
<b>Figure 20.</b> Résultats de l'évaluation de la texture .....	51

<b>Figure 21.</b> Résultats de l'évaluation de la saveur .....	51
<b>Figure 22.</b> Résultats de l'analyse hédonique de la saveur des margarines étudiées.....	52
<b>Figure 23.</b> Résultats de l'analyse hédonique de la couleur, la texture et l'odeur des margarines étudiées.....	52

## LISTE DES ABREVIATIONS

- ABTS** : radical 2,2-azinobis-éthylbenzothiazoline-6-sulphonate
- AGPI** : Acide Gras Polyinsaturé
- ANOVA**: Analyse de la variance
- AOCS**: American Oil Chemist Society
- APR** : Pouvoir Antioxydant Relatif
- BHA**: Butyl Hydroxy Anisole
- BHT**: Butyl Hydroxy Toluène
- CCM** : Chromatographie sur Couche Mince
- CPG**: Chromatographie Phase Gazeuse
- DMPD** : radical N, N'-p-di-méthylque-phénylènediamine
- DO** : Densité Optique
- DPPH**: 2,2-Diphenyl-1-Picryl Hydrazyl
- DSA** : Direction des Services Agricole
- EC50**: Concentration Efficace à 50%
- FDA**: Food and Drug Administration
- FID**: Détecteur à ionisation de flamme
- Fp**: Facteur de protection
- HCNO**: Huile de Coprah Hydrogénée
- HDL-Cholesterol**: High Density Lipoprotein
- HE<sub>1</sub>** : Huile essentielle de *Citrus limon* extraite par expression à froid
- HE<sub>2</sub>** : Huile essentielle de *Citrus limon* extraite par hydrodistillation
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxyde d'hydrogène
- HO°** : radical hydroxyle
- HOCl** : acide hypochloreux
- HPO**: Huile de Palme Hydrogénée

**LDL-Cholesterol:** Low Density Lipoprotein

**$^1\text{O}_2$ :** oxygène singulet

**$\text{O}^\circ_2$ :** Superoxyde

**ORAC :** capacité d'absorbance du radical de l'oxygène

**PG:** Gallate Propylée

**PI:** Période d'Induction

**PLC :** Photochemi-luminescence

**RH :** acide gras insaturé

**RMN:** Résonance Magnétique Nucléaire

**$\text{R}^\circ$  :** radical alcoyle

**$\text{ROO}^\circ$  :** radical peroxy

**ROOH :** Peroxyde

**SFC:** Solid Fat Content

**TBHQ:** Tétrabutyl Hydroquinone

**UV :** Ultra Violet

# INTRODUCTION

## INTRODUCTION

Maîtriser l'oxydation est indispensable pour gérer l'évolution des systèmes biologiques dans leur complexité, en particulier dans le cas des aliments dont la dégradation peut avoir des conséquences en sécurité alimentaire. Parmi ces produits alimentaires, la margarine ; émulsion plastique constituée essentiellement de deux phases grasse et aqueuse, elle contient en outre 2 % d'additifs hydro et liposolubles. 82% de sa composition est représentée par un mélange d'huiles : première cible de l'oxydation (Karleskind, 1992).

L'oxydation des lipides est une cause majeure de dégradation de la margarine lors de sa fabrication et de sa conservation. La conséquence la plus perceptible de celle-ci est l'apparition d'odeurs désagréables. Ces odeurs conduisent souvent au rejet du produit par le consommateur (Prior, 2003). Ainsi, pour garantir une durée de conservation plus prolongée, les antioxydants sont-ils largement utilisés.

Vue l'importante capacité de production de la margarinerie de Cévital, l'utilisation des antioxydants ne cesse d'augmenter. Le Tocoblend s'avère le plus employé, mais économiquement parlant ce dernier est très coûteux. Ainsi, les substances naturelles douées d'activité anti-oxydante présenteraient-elles un intérêt socioéconomique sans équivoque.

Pour être classées comme antioxydants alimentaires idéals, les huiles essentielles doivent être facilement incorporables, efficaces à faible dose, non toxiques, n'entraînent ni coloration, ni odeur, ni saveur indésirables, résistantes aux processus technologiques et stables dans le produit fini. Dans ce contexte, s'inscrit ce présent travail dont les principaux objectifs sont de valoriser les écorces (zestes) du citron par l'utilisation de leurs huiles essentielles comme additif alimentaire naturel dans la margarine de table en substitution à l'additif synthétique (le Tocoblend), de diversifier les différents types de margarine de table existants sur le marché et d'utiliser un additif ou antioxydant alimentaire moins coûteux.

Ce travail est structuré en trois parties, initié par une synthèse bibliographique mettant l'accent sur la margarine, les antioxydants, l'activité anti-oxydante et les huiles essentielles de *Citrus limon*. La deuxième partie concerne la méthodologie suivie, elle est subdivisée en deux volets : le premier traite l'extraction des huiles essentielles du citron par expression à froid et par hydro-distillation ainsi que l'étude de leur pouvoir antioxydant par la méthode de DPPH° et par le test de blanchissement de  $\beta$ -carotène ; le deuxième volet élucide l'élaboration des margarines aux huiles essentielles du citron et la comparaison de leur résistance à

l'oxydation par rapport à la margarine témoin par les tests de Rancimat et Schaal. Enfin la dernière partie regroupe l'ensemble des résultats obtenus et leurs discussions suivie d'une conclusion générale.

**SYNTHESE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

## **Chapitre I. MARGARINE**

L'histoire de la margarine remonte à 1869 : Napoléone III lance un concours pour inventer une nouvelle matière grasse moins chère que le beurre, destinée aux pauvres et aux armés. C'est le pharmacien Hippolyte Mège Mouriés qui remporte le prix (Adersan et Williams, 1965 *In* Baljit *et al.*, 2002).

La margarine, fabriquée au début à partir de graisse de bœuf est considérée comme un substitut bon marché du beurre, elle ne fit pas pour autant l'unanimité (Chrysam, 1985). Dans les années 1950, l'industrie de la margarine modernise l'image du produit, fabriqué entre-temps à base d'huiles végétales (Chrysam, 1996 *In* Laia *et al.*, 2000), en s'appuyant sur les nouvelles préoccupations des consommateurs : la santé et la minceur (Roger, 1974). Avec l'appui des laboratoires pharmaceutiques, les partisans plaident en faveur des acides gras insaturés (Laia *et al.*, 2000), et de la réduction du cholestérol dans les aliments afin de réduire le nombre d'infarctus (Baljit *et al.*, 2002).

Selon Karleskind (1992), La margarine se définit comme étant une émulsion de type huile dans l'eau qui comprend deux phases essentielles :

- Une phase continue: phase grasse.
- Une phase dispersée: phase aqueuse.

Elle contient aussi des additifs (lécithine, sel, colorant, antioxydants, vitamines, etc.) répartis en partie dans la phase grasse et en partie dans la phase aqueuse (Faur, 1996 ; Dimitrios *et al.*, 2003).

La définition complète de la margarine est donc celle d'un système polydispersé de corps gras à l'état solide et à l'état liquide, d'eau et/ou lait, d'ingrédients et quelquefois de bulles de gaz (Karleskind, 1992 ; Vierling, 1999).

### **I- Composition globale**

Selon Karleskind (1992), FDA (1993) *In* Koca *et al.*, 2010 et Faur (1996), toutes les margarines ont en général une composition globale identique :

- 80 % à 82 % de lipides, appelé phase grasse ;
- 16 % à 18 % d'eau et/ou lait, constituant la phase aqueuse ;
- 2 % d'additifs, obligatoires (antioxydants, sel, etc.) ou facultatifs (amidon, sucre, etc.)

## **II- Types de margarines**

La margarine a été conçue pour remplacer le beurre et a été fortifiée avec des vitamines A, D, E, et sa composition est réglementée par des lois et des normes d'identité dans chaque pays (Karleskind, 1992).

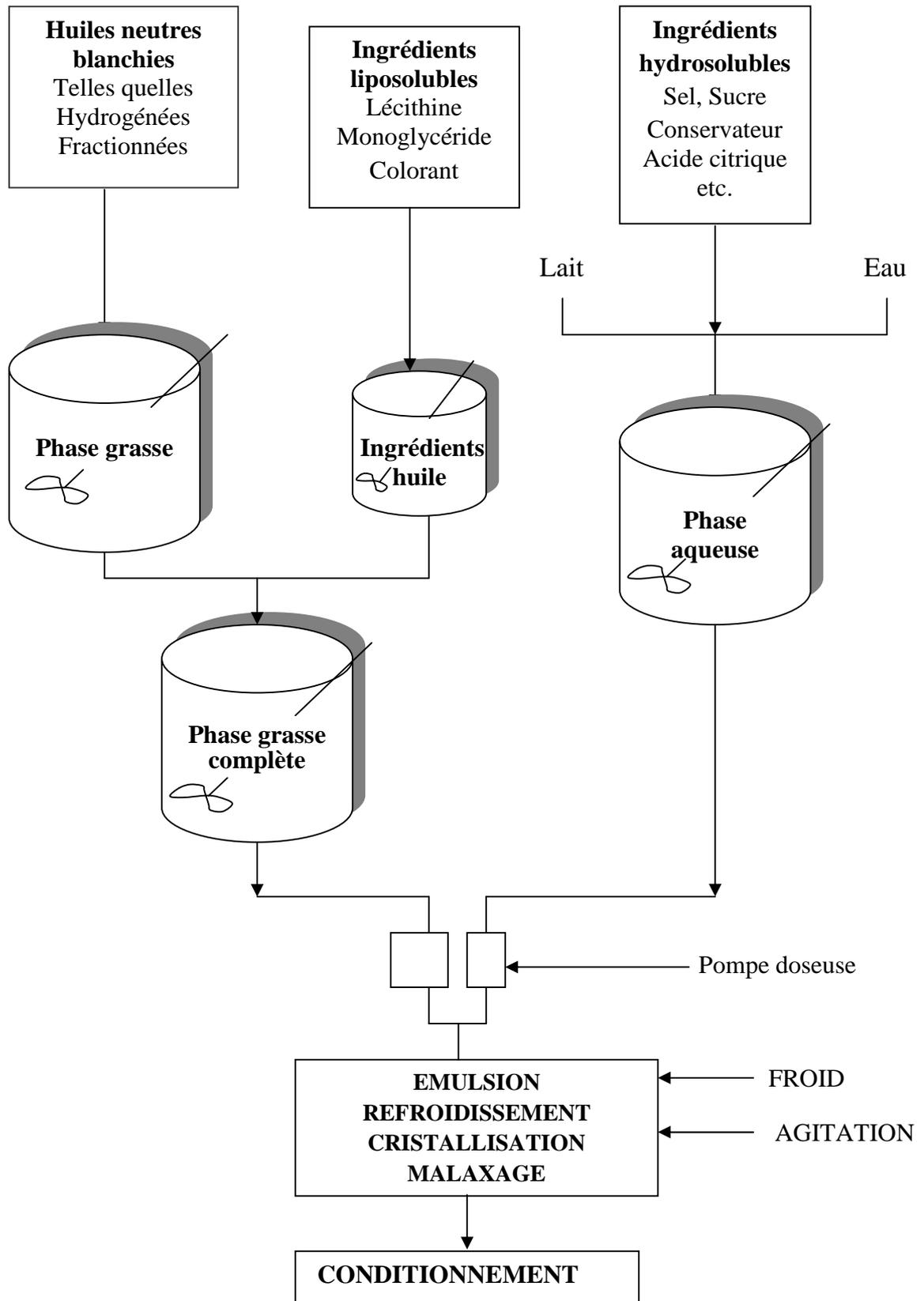
Aujourd'hui il existe un grand nombre de margarines qui se différencient par la composition des deux phases. La margarine boulangère est plus ferme et n'exige aucune réfrigération, elle est formulée pour la bonne tenue de la pâte pâtissière (Manley, 1983 *In* Miskandar, 2005) ; la margarine de table ; un type avec un apport élevé en acides gras polyinsaturés principalement, acide linoléique de 20 à 30 %, 25 à 40 % d'acides mono-insaturés, 10 à 30 % d'acides gras saturés, 15 à 30 % d'acides gras *trans* (Nawar, 1985). Margarine douce battue ; contenant jusqu'à 50 % d'air injecté, disponible aux Etats-Unis emballée dans du papier aluminium, et enveloppée hermétiquement dans un carton d'aluminium laminé (Miskandar *et al.*, 2005). Pour la margarine enrichie en phytostérols ou margarine "santé" c'est la fameuse Pro.activ (Miettinen *et al.*, 1995) : 20 g par jour (environ 4 tartines) permettraient de réduire de 15 à 20 % le taux de LDL-cholestérol (correspondant à une réduction de plus de 40 % des risques cardiovasculaires), et cela sans modifier le taux de HDL-cholestérol (Ayesh *et al.*, 1999). Cette margarine se caractérise par un enrichissement en certains composés, les phytostérols (stérols d'origine végétale) (Serfaty-Lacrosniere *et al.*, 2001). Or la force de Pro.activ est d'avoir enrichi sa margarine pour arriver à 8 % de phytostérols. Ses qualités ont été démontrées par de nombreuses études scientifiques. Ce produit est destiné aux gens souffrant d'hypercholestérolémie (Girardet, 2006 ; Ho et Pal, 2005 ; Vogt *et al.*, 2004 ; Mussner *et al.*, 2002).

Il est difficile de donner une même composition typique des margarines tant celles-ci peuvent varier en fonction des utilisations (Miskandar *et al.*, 2005).

## **III- Schéma général de fabrication**

Selon DeMan *et al.* (1994), la fabrication de la margarine est une technologie connue et maîtrisée (figure 1). Elle comprend succinctement les phases suivantes :

➤ Préparation de la phase grasse complète : huiles et graisses telles quelles raffinées et/ou modifiées par hydrogénation, interstérification ou fractionnement ; lécithine, monoglycérides et colorants ;



**Figure 1.** Schéma général de fabrication de la margarine (Karleskind, 1992)

- Préparation de la phase aqueuse complète : eau, lait, sel, sucre, arôme, conservateurs, correcteur de pH, etc.
- Préparation de l'émulsion ; mélange des deux phases précédentes ;
- Refroidissement, cristallisation, malaxage de l'émulsion de manière à lui conférer les caractéristiques rhéologiques espérées et la stabilité désirée ;
- Conditionnement du produit sous enveloppage (margarines traditionnelles) ou en pots confectionnés en différents matériaux.

La phase grasse représente la partie la plus importante (82 à 84%) de l'émulsion. Elle est constituée par un mélange d'huiles raffinées et d'huiles concrètes d'origines végétales, animales et/ou marines selon les caractéristiques de la margarine souhaitées par la production, c'est-à-dire que le choix des huiles de cette phase détermine, en grande partie, la qualité du produit fini, notamment : la texture, la consistance et le point de fusion (Faur, 1996 ; FDA, 1993 *In Koca et al.*, 2010).

La phase aqueuse quant à elle représente environ 16 à 18 % de la composition globale de la margarine. Elle est constituée soit d'eau soit de lait, soit d'un mélange eau/lait. Elle est la plus sensible des constituants de la margarine, à des contaminations microbiennes, et nécessite donc une pasteurisation préalable (Karleskind, 1992).

### **III-1- Additifs liposolubles**

Les émulsifiants ; composés ayant des propriétés tensioactives, dues à leur caractère amphipatique : leurs structures chimiques étant composées à la fois de groupes hydrophiles et lipophiles et de ce fait pouvant se dissoudre dans les deux phases, permettant leur union sous forme d'émulsion homogène. Les émulsifiants utilisés dans les margarines sont la lécithine, les mono et diglycérides. La couleur de la margarine doit être assez voisine de celle du beurre, elle est obtenue soit par addition d'huile de palme rouge riche en caroténoïdes, soit de  $\beta$ -carotène de synthèse (Luterotti *et al.*, 2006).

Les margarines sont souvent aromatisées par le diacétyl arôme, naturel du beurre ou le butane Dione 1,3 de synthèse. On utilise une solution dans l'huile à 4 %. Au-delà d'une certaine limite, le goût n'est pas agréable et jugé comme artificiel. La présence d'eau rend la margarine très sensible à l'oxydation. La meilleure protection est de maintenir le produit fini à l'abri de l'oxygène, mais on peut aussi ajouter des antioxydants via la phase grasse, qui ont pour rôle d'éviter l'apparition du rancissement en retardant l'oxydation des huiles (FDA, 1993 *In Koca et al.*, 2010 ; Faur, 1996).

### **III-2- Additifs hydrosolubles**

Le sel est, en premier lieu, ajouté pour améliorer la sapidité, mais il peut jouer un rôle protecteur, bactériostatique. Les teneurs peuvent varier de 0.1 à 1 et même 2 %. Le sel utilisé doit être de qualité alimentaire, pratiquement anhydre, avec absence de sels de magnésium, de fer et d'ions  $SO_2$  qui accélèrent l'oxydation des graisses. En solution dans l'eau, il doit donner une saumure limpide et claire.

L'amidon est considéré comme étant un révélateur, à une dose de 0.2 % ; il permet de différencier la margarine du beurre, quoiqu'il existe actuellement d'autres moyens de les distinguer (CPG). Le sucre (saccharose) augmente les qualités organoleptiques, et donne la douceur aux margarines, il est utilisé dans les margarines de tables à raison de 0.2 à 0.3 % (FDA, 1993 *In Koca et al.*, 2010 ; Faur, 1996).

### **IV- Facteurs de détérioration de la margarine**

Les facteurs d'altération de la margarine peuvent être d'ordres physique ou chimique et surtout bactériologique.

La margarine, étant formée d'un pourcentage élevé de matières grasses, est sensiblement exposée à l'oxydation. Cette dernière est à l'origine de l'odeur de rance, elle est liée à :

- la lumière : en particulier les rayons UV qui exercent une action catalytique ;
- la température élevée et la durée de stockage ;
- la présence des germes lipolytiques ;
- le taux d'insaturation que contient la phase grasse ;
- l'exposition de la margarine à l'oxygène atmosphérique.

L'altération physique est due à la modification de la consistance de la margarine. Elle est due à son tour au phénomène de recristallisation. La formation de ces cristaux entraîne la réduction de la phase liquide par rapport à la phase solide et conduit en général à la perte de la texture, la flaveur et l'apparence recherchée (McClement *et al.*, 2000 ; Genot *et al.*, 2003).

## **Chapitre II. ANTIOXYDANTS ET ACTIVITE ANTIOXYDANTE**

L'oxydation des lipides est une cause majeure de dégradation de la margarine lors de sa fabrication et de sa conservation, elle affecte les acides gras insaturés présents. Les recommandations nutritionnelles conseillent d'augmenter la part relative des acides gras polyinsaturés (AGPI) dans la ration en raison notamment de leur rôle dans la prévention de pathologies du système cardiovasculaire et de l'obésité (Martin, 2001 *In* Villière et Genot, 2006). Or la présence dans la margarine de ces AGPI particulièrement sensible à l'oxydation pose le problème de la maîtrise de la stabilité de tels systèmes (Villière et Genot, 2006).

La conséquence la plus perceptible de l'oxydation des lipides est l'apparition d'odeurs et de saveurs désagréables. Ces odeurs conduisent souvent au rejet du produit par le consommateur. Cette oxydation peut également induire une modification de la couleur des produits par co-oxydation des pigments qu'ils soient liposolubles ou hydrosolubles ; c'est le cas des caroténoïdes dans la margarine (Prior, 2003).

L'oxydation des lipides est une réaction radicalaire en chaîne (Labuza, 1971 ; Frankel, 1980), où un acide gras insaturé (RH) transformé en radical ( $R^\circ$ ) dans une étape d'initiation, réagit avec l'oxygène dans une étape de propagation pour conduire à un radical peroxy ( $ROO^\circ$ ), ce dernier réagit à son tour avec une molécule d'acide gras pour régénérer un radical ( $R^\circ$ ) et former un peroxyde ( $ROOH$ ) (Charles et Darrigol, 1987 ; Alais *et al.*, 2003).

### **I- Etapes et facteurs favorisant l'oxydation des lipides**

L'oxydation des lipides est une réaction dont les principaux mécanismes sont aujourd'hui bien décrits et les cinétiques et les facteurs de variation sont globalement connus (Labuza, 1971 ; Frankel, 2005). C'est une réaction radicalaire en chaîne généralement schématisée en trois étapes (figure 2). La première de ces étapes est l'étape d'amorçage, ou initiation, au cours de laquelle il y a génération des premiers radicaux alkyle ( $R^\circ$ ) à partir des acides gras insaturés (RH). Cette première étape peut être modulée par de nombreux facteurs, notamment les traitements subis, comme le chauffage ou l'exposition à la lumière (Karleskind, 1992), les métaux présents à l'état de traces dans les matières premières ou apportés par les procédés de transformation (Villière et Genot, 2006). Ces conditions correspondent à des conditions courantes de conservation de nombreux aliments (Alais *et al.*, 2003).

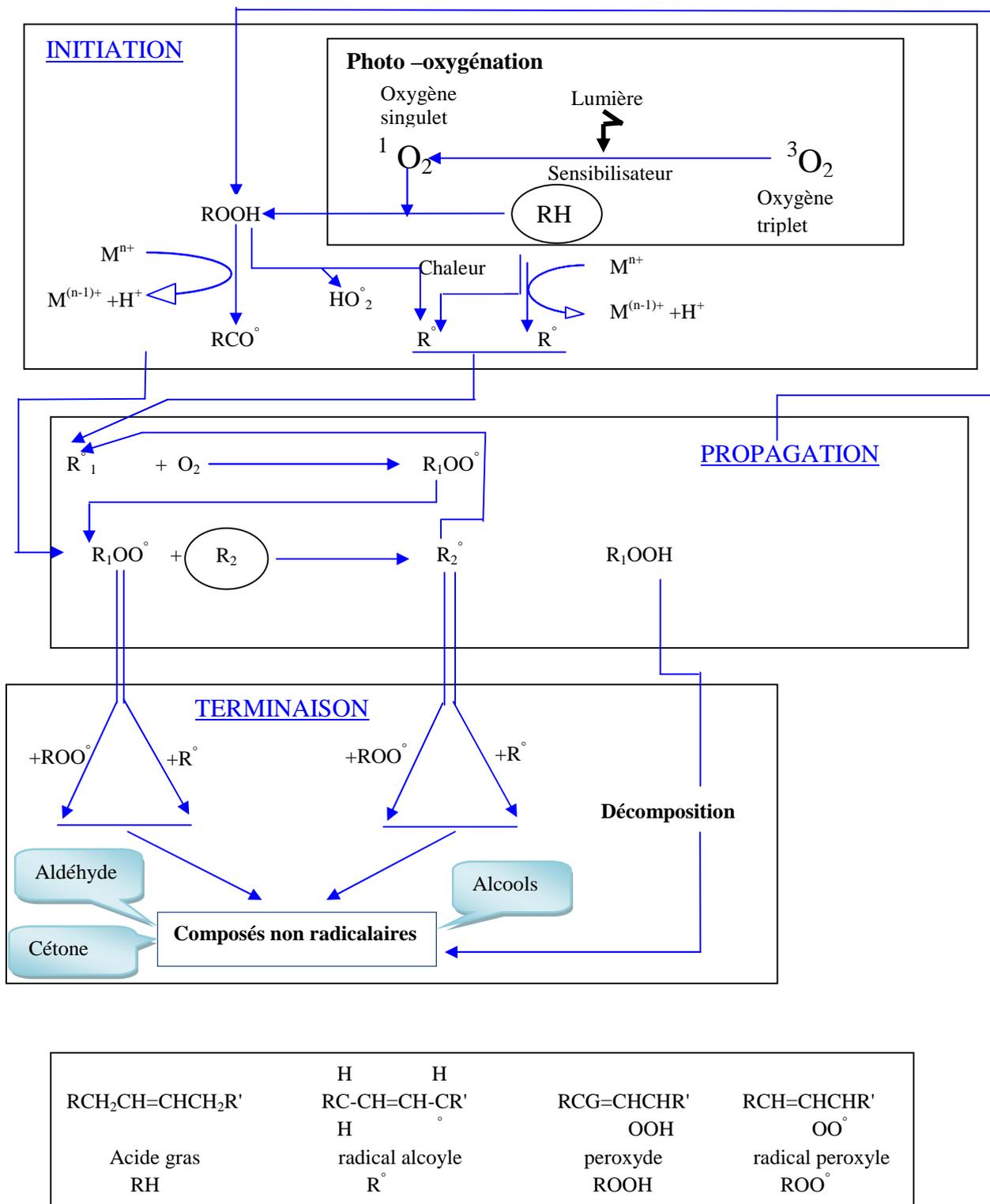


Figure 2. Mécanisme général des réactions d'oxydation des lipides (Alais *et al.*, 2003).

La deuxième étape réactionnelle est l'étape de propagation, au cours de laquelle les radicaux alkyles précédemment formés réagissent avec l'oxygène moléculaire pour former des radicaux peroxyde ( $\text{ROO}^\circ$ ) (Fazzalari, 1978 *In* Villière et Genot, 2006). Ces derniers réagissent à leur tour avec des acides gras et forment des hydroperoxydes ( $\text{ROOH}$ ) et de nouveaux radicaux alkyles, engageant ainsi de nouveaux cycles réactionnels (Grosch, 1982). Les hydroperoxydes, produits primaires de la réaction, sont des molécules instables. Ils se décomposent sous l'effet de la chaleur ou des métaux en donnant naissance à des produits secondaires. Parmi ces derniers, les composés volatils sont à l'origine de la modification de l'odeur des produits oxydés (Lehucher-Michel *et al.*, 2001).

La troisième étape est la terminaison : les espèces radicalaires réagissent entre elles pour donner des espèces non radicalaires (cétones, aldéhydes et alcools responsables de l'altération organoleptique) mettant ainsi fin aux cycles réactionnels (Kohen et Nyska, 2002).

La connaissance des mécanismes réactionnels de l'oxydation des lipides reste cependant incomplète. De ce fait, les connaissances actuelles ne suffisent pas à maîtriser parfaitement le phénomène qui demeure difficile à prévenir (Genot *et al.*, 2004).

Garantir la durée de vie des aliments sensibles à l'oxydation demeure ainsi parfois une gageure, même en ayant recours de façon massive aux antioxydants (Villière et Genot, 2004). Ces antioxydants sont utilisés dans des industries très diverses et jouent un rôle prépondérant dans l'industrie alimentaire. Certains d'entre eux, les tocophérols sont présents de façon naturelle dans les huiles et corps gras, mais le plus souvent il est nécessaire d'en ajouter pour améliorer la conservation des aliments, en particulier celle des corps gras (Alais *et al.*, 2003).

Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques (Boyd *et al.*, 2003). Les antioxydants sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs (Dupin *et al.*, 1992 ; Neve, 1995).

La raison pour laquelle les antioxydants sont importants vient du fait que l'oxygène est un élément potentiellement toxique puisqu'il peut être transformé en formes plus réactives telles que le superoxyde ( $\text{O}_2^\circ$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) et les radicaux hydroxyle ( $\text{HO}^\circ$ ), collectivement connu sous le nom d'oxygène actif (Boyd *et al.*, 2003 ; Hadi, 2004).

Selon Neve (1995) et Berger (2006), la stabilité de la structure des antioxydants leur permet d'agir pour former des produits finis non radicaux en:

- ◆ réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras;
- ◆ absorbant l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur;
- ◆ s'oxydant lui-même plus rapidement qu'un substrat à risque d'oxydation.

## **II-Types d'antioxydants**

Les antioxydants sont classés selon leur origine en antioxydants naturels ou synthétiques et selon leur mode d'action en antioxydants primaires ou secondaires.

### **II-1-Antioxydants synthétiques**

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tels que le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), la gallate propylée (PG) et le tétra-butylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matières de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture (Lisu *et al.*, 2003).

### **II-2-Antioxydants naturels**

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydant *in vivo*. Elles incluent le bêta carotène, l'albumine, l'acide urique, les œstrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E, etc. Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres (Svoboda et Ampson, 1999 *In* Mohammedi, 2006).

### **II-3-Antioxydants synergistes**

Ce sont des substances qui ne sont guère actives en tant qu'antioxydants, et dont les propriétés apparaissent surtout en présence d'autres antioxydants. Il en est ainsi des lécithines, des acides citrique et tartrique, des acides aminés (lysine et arginine), de certains flavonoïdes. Leurs propriétés peuvent s'expliquer par un effet chélatant de métaux comme le fer et le cuivre qui ont un effet pro-oxydant à faibles doses. Certains produits ont un effet inhibiteur de la décomposition des hydroperoxydes, et d'autres semblent régénérer des antioxydants,

comme les tocophérols ou les dérivés de l'acide ascorbique à partir de leurs formes oxydées (Morelle, 1988).

#### **II-4-Antioxydants primaires**

Ils englobent les composés qui interfèrent avec l'oxydation lipidique en convertissant les produits d'oxydation lipidiques ( $L^\bullet$ ,  $LOO^\bullet$ ,  $LO^\bullet$ ) en produits plus stables (LH, LOOH, LOH) grâce à leur propriété de donateurs de protons actifs. Le radical ( $A^\bullet$ ) dérivé de l'antioxydant se convertit en produit stable (Kim et Lee, 2004).

#### **II-5-Antioxydants secondaires**

Selon Gordon (1990), les antioxydants secondaires sont des composés qui retardent l'oxydation lipidique selon différents modes d'action :

- absorption des radiations ultraviolettes ;
- inactivation de l'oxygène singulet ;
- chélation des métaux ;
- décomposition des hydroperoxydes.

### **III- Toxicité des antioxydants**

Les premières indications des effets possibles des antioxydants sur la santé datent des années 1970, alors que des chercheurs ont constaté que l'incidence réduite de certains cancers et de maladies coronariennes allait pair avec une diète riche en fruits, légumes et herbes. Or, il s'avère que ces végétaux regorgent d'antioxydants (Berger, 2006). L'intégration de molécules d'antioxydants à des denrées alimentaires constitue tous de même un défi. On reconnaît la fragilité à la chaleur de la vitamine C, qui est par ailleurs l'un des plus puissants antioxydants (Lehucher-Michel *et al.*, 2001).

L'ajout de vitamine E peut également poser des problèmes si on n'a pas prévu un emballage qui prévient l'oxydation par la lumière. De plus la surconsommation d'antioxydants peut entraîner une déficience des systèmes naturels de protection de l'organisme (système immunitaire) et cela peut nuire la santé en altérant de nombreuses fonctions vitales. Certains antioxydants sont responsables aussi à des réactions allergiques, des hypersensibilités, des troubles digestifs, etc. (Roberfroid, 2002).

Selon Alais *et al.* (2003), les produits de synthèse ont été beaucoup étudiés sur le plan de la toxicologie chez l'animal. Des résultats variant avec les espèces ont été donnés : effet sur

les poumons, le foie, la thyroïde, la coagulation sanguine ou l'action cancérigène. On ne peut les extrapoler à l'homme, mais on est porté à réduire leur emploi dans l'alimentation humaine.

#### **IV- Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante**

Maîtriser l'oxydation est indispensable pour gérer l'évolution des systèmes biologiques dans leur complexité en particulier dans le cas des aliments dont la dégradation peut avoir des conséquences en sécurité alimentaire (Marc *et al.*, 2004).

Les méthodes d'évaluation du pouvoir antioxydant peuvent être qualitatives ou quantitatives. Les méthodes qualitatives, utilisées pour repérer l'activité antioxydante de composés, sont relativement peu nombreuses et font intervenir en général, la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'agents antioxydants. Une des méthodes utilisées pour la détection d'antioxydants est la chromatographie sur couche mince (CCM), qui donne naissance à des réactions colorées en présence de tels composés (Li Peiwu *et al.*, 1999). Une autre méthode a été proposée par Glavind et Holmer (1967) qui combine la méthode précédente avec la détection visuelle pour l'évaluation de l'activité de balayage de radical libre des fractions antioxydantes en employant le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

En ce qui concerne l'évaluation quantitative de l'activité antioxydante, beaucoup de méthodes peuvent être appliquées pour estimer directement l'activité antioxydante. La génération de radical libre est reliée avec l'oxydation dans les aliments et les systèmes biologiques. Les méthodes principales comportent, le balayage des radicaux de superoxyde ( $O_2^\circ$ ) ; le balayage de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ; le balayage d'acide hypochloreux (HOCl) (Sanchez-moreno, 2002) ; le balayage du radical d'hydroxyle ( $HO^\circ$ ) ou le balayage du radical du peroxyde ( $ROO^\circ$ ). Parmi ces méthodes, la méthode de PIEGE (paramètre total d'antioxydant de radical en piégeage (Basseur *et al.*, 1995) ; la méthode d'ORAC (capacité d'absorbance du radical de l'oxygène) (Cao *et al.*, 1993) ; la méthode d'ABTS (le balayage du radical 2,2-azinobis-éthylbenzothiazoline-6-sulphonate) (Duthie *et al.*, 1991 *In* Maamri, 2008) ; le balayage du radical stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (la méthode du radical DPPH $^\circ$ ) (Blois, 1958 ; Uchiyama *et al.*, 1968) ; la méthode de DMPD (le balayage du radical N,N'-p-di-méthylque-phénylènediamine) (Li *et al.*, 1994) ou la méthode de Photochemiluminescence (PLC) (Magin *et al.*, 2000).

### **Chapitre III. HUILES ESSENTIELLES DE *Citrus limon***

#### **I- Plante de *Citrus limon***

Le citronnier est un arbuste originaire du sud-est asiatique, cultivé sur le littoral de la Méditerranée et dans toutes les régions du globe à climat semi-tropical (Dubois, 2006 ; Debuigine et Couplan, 2008). Les fruits sont de forme ovale, avec un mamelon plus au moins apparent à leurs extrémités. La peau fine est colorée en jaune à maturité du fruit; elle est pourvue de nombreuses glandes oléifères renfermant des essences. La pulpe, de coloration jaune ou verdâtre, est généralement riche en acide citrique, ce qu'il lui donne sa saveur acide (Blancke, 2001).

Cette plante est l'une des agrumes les plus vigoureuses, de croissance rapide, elle produit de nombreuses branches et fructifie abondamment, et la fructification de l'hiver est plus importante (de 60 à 70% de production annuelle de l'arbre) (Dubois, 2006). Les principales variétés méditerranéennes cultivées de citronnier sont «Verna », «Eureka », «Lisbonne », «Monachello », «Interdonato » et «Lunaris » (Blancke, 2001).

Selon Padrini et Lucheroni (1996), la classification de citron est la suivante :

**Règne** : *Plantae*

**Ordre** : *Sapindales*

**Famille** : *Rutaceae*

**Genre** : *Citrus*

**Espèce** : *Citrus limon*

#### **II- Généralités sur les huiles essentielles**

La norme AFNOR NF T 75-006 (1998) In Bruneton, 1993 a donné comme définition d'huile essentielle : « produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des *Citrus*, soit par distillation sèche. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques ».

## **II-1-Rôle physiologique**

Beaucoup de plantes produisent les huiles essentielles en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante est inconnu (Rai *et al.*, 2003 *In* Mohammedi, 2006).

Il y a beaucoup de spéculations au sujet du « rôle » d'huiles essentielles des plantes. Certainement plusieurs effets apparents « utiles » ont été décrits : protection contre la flore microbienne infectieuse par les propriétés fongicides et bactéricides et contre les herbivores par goût et effets défavorables sur le système nerveux (Porter, 2001).

Certains auteurs pensent que la plante utilise l'huile pour repousser ou attirer les insectes, dans ce dernier cas, pour favoriser la pollinisation. D'autres considèrent l'huile comme conservateur de l'humidité des plantes dans les climats désertiques (Belaiche, 1979).

## **II-2-Composition chimique**

Les huiles volatiles sont des mélanges très complexes, les constituants sont principalement des monoterpènes et des sesquiterpènes de formule générale  $(C_5H_8)_n$ , les composés oxygénés dérivés de ces hydrocarbures incluent des alcools, des aldéhydes, des esters, des éthers, des cétones et des phénols. On estime qu'il y a plus de 1000 monoterpènes et 3000 de structures sesquiterpènes. D'autres composés incluent des phenylpropanes et des composés spécifiques contenant le soufre ou l'azote (Svoboda et Hampson, 1999 *In* Mohammedi, 2006).

La norme ISO : NF T 75-335 (1995) *In* Robert et Lobstein (2005) a donné la composition de l'huile essentielle extraite par expression de l'écorce du *Citrus limon* avec un rendement de 1,2 à 1,5%. Les principaux constituants sont le limonène (65 à 70%), le citral (1 à 5%), le  $\beta$ -pinène (4 à 9%), le  $\gamma$ -terpinène (9 à 12%), le linalol (1,5%), le cinéole, d'acétate de géranyle, le nonanal, le citronellal, l' $\alpha$ -terpinéol, le camphène et l' $\alpha$ -bisabolène.

## **II-3- Localisation et lieu de synthèse**

Les huiles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : feuilles, fleurs, écorces, bois, racines, rhizomes, fruits et graines. La synthèse et l'accumulation sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante : cellules à l'huiles essentielles des Lauracées (*Camphora officinarium*) ou des Zingiberaceae (*Zingiber officinale*), poils sécréteurs des Lamiacées

(*Mentha spicata*), des poches sécrétrices des Myrtacées (*Eucalyptus leucoxylon*) ou des Rutacées (*Citrus limon*), canaux sécréteurs des Apiacées (*Daucus carota*) ou des Astéracées (*Anthemis tomentosa*) (Garnero, 1991). Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce (*Schinus molle*), voire dans un même organe (fruits de *Citrus limon*) (Bruneton, 1993).

Les diverses espèces du genre *Citrus* élaborent et stockent, dans des poches schizolysigènes localisées dans la partie externe du mésocarpe du fruit (flavedo), des huiles essentielles. C'est cette localisation particulière qui permet de les récupérer directement par « expression » (Bruneton, 1999).

Les trichomes glandulaires sont les sites primaires de la biosynthèse d'huile essentielle. Les plantes qui manquent de telles structures spécialisées synthétisent et amassent seulement des traces de monoterpènes ainsi que le procès sécréteur d'huile et le mécanisme ont une incidence directe avec la production de l'huile et le potentiel du système producteur (Sharma et Maguer, 2003).

#### **II-4- Procédés d'obtention**

Les huiles essentielles de citron peuvent être obtenues de différentes manières : par expression des écorces; par scarification du fruit entier puis expression ou par hydrodistillation (Garnero, 1991 ; Bruneton, 1999 ; Sousa *et al.*, 2002 ; Adio, 2005).

L'extraction peut aussi se faire au moyen d'un solvant qui change selon la partie de la plante utilisée et la fragilité de l'huile ou par l'enfleurage (pour les produits cosmétiques) (Crespo *et al.*, 1991).

##### **II-4-1-Entraînement à la vapeur d'eau**

L'hydrodistillation consiste à immerger directement le matériel végétal (intact ou broyé) dans un alambic rempli d'eau, ensuite porter le tout à l'ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par la différence de densité (Bruneton, 1999).

Dans la distillation à vapeur saturée, le végétal n'est pas en contact avec l'eau. La vapeur d'eau est injectée à travers la masse végétale disposée sur une plaque perforée (Belaiche, 1979). En se dirigeant vers la plante, la vapeur fait éclater les cellules contenant l'essence et entraîne avec elle les molécules odorantes (Padrini et Lucheroni, 1996).

#### **II-4-2-Expression des épicarpes de *Citrus***

L'expression des épicarpes se fait par dilacération des agrumes pour libérer le contenu des poches sécrétrices. Ce dernier est récupéré par un procédé physique après agitation. Le procédé classique consiste à exercer, sous un courant d'eau, une action abrasive sur la surface de fruit. Après élimination des déchets solides, l'huile est séparée de la phase aqueuse par différence de densité (Bruneton, 1999 ; Werner, 2002).

#### **III- Facteurs de variabilité**

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant diverses conditions : l'environnement, le génotype, origine géographique, la période de récolte, le séchage, sa température et sa durée (Smallfield, 2001).

#### **III-1-Dénomination botanique et partie de la plante**

Une huile essentielle doit être rapportée au matériel botanique d'où elle est issue, d'où l'importance accordée à la nomenclature (Garnero, 1976 ; Perry *et al.*, 1999 ; Barry, 2001). Elle peut s'extraire de plusieurs parties de la plante, la quantité et la qualité diffèrent, d'où la nécessité de spécifier le nom de la partie utilisée (Bruneton, 1999 ; Couderc, 2001).

#### **III-2-Cycle végétatif**

Une essence reste modulable en fonction des besoins particuliers de la plante. Sa composition n'est pas statique (Bruneton, 1987 ; Perry *et al.*, 1999).

Les éventuelles modifications sont conséquentes principalement des conditions météorologiques ainsi que du stade végétatif. Par ailleurs, la plante pourra utiliser son essence à un stade avancé de son élaboration pour sa propre défense immunitaire.

Des variations importantes peuvent se produire au cours du cycle végétal autant en ce qui concerne le rendement et la composition chimique en huile essentielle (Garnero, 1991 ; Perry *et al.*, 1999).

#### **III-3-Facteurs extrinsèques**

Il s'agit là de l'incidence des facteurs de l'environnement et des pratiques culturales (l'apport d'engrais et l'influence des variations N.P.K., régime hydrique), la température, la

durée totale d'insolation et le régime de vents exercent une influence directe (Bruneton, 1999 ; Couderc, 2001), sans ainsi oublier les facteurs géographiques et édaphiques (Garnero, 1991).

#### **IV-Toxicité des huiles essentielles**

L'utilisation des huiles essentielles du citron extraites soit par hydrodistillation soit par expression à froid ne présente aucun risque de toxicité, ni aiguë ni chronique (Robert et Lobstein, 2005).

Les huiles essentielles contenant des phénols, tels que le thym, la cannelle et le clou de girofle, devraient être employées avec prudence. La toxicité du foie peut se produire si les huiles essentielles sont utilisées à de fortes doses pendant un temps prolongé. Les cétones contenues dans l'armoise, la sauge et les huiles d'hysope peuvent ainsi causer ce genre de problème (Bruneton, 1993 ; Couderc, 2001).

#### **V- Utilisation des huiles essentielles**

Dans le domaine agroalimentaire, l'huile essentielle du citron sert à la fabrication d'arômes alimentaires, d'essences fruitées, de boissons rafraichissantes, de liqueurs, de pâtisseries et de confiseries (Iserin *et al.*, 1996, Robert et Lobstein, 2005).

Les huiles essentielles issues des sécrétions des plantes aromatiques et médicinales montrent des propriétés d'intérêt alimentaire, cosmétique, thérapeutique et pharmacognosique (Iserin *et al.*, 1996).

C'est en gastronomie que se fait le plus large emploi des plantes à essences sous forme d'épices. Celles-ci sont réparties en épices aromatiques (arômes amers et acres) comme dans le cas du faux poivrier, ou simplement en épice pour les desserts et pâtisseries (Bruneton, 1999). Les huiles essentielles peuvent également être ajoutées dans les produits alimentaires destinés à la conservation (produits de la quatrième gamme). Elles s'ajoutent sur les produits de consommation dans le but d'aromatisation (quelques gouttes déposées sur les morceaux du sucre) (Pingot, 1998).

**MATERIEL  
ET  
METHODES**

## **MATERIEL ET METHODES**

### **I-Matériel végétal**

Le produit ayant servi à l'extraction des huiles essentielles est la partie écorce (zeste) du citron (*Citrus limon*). Ce choix est justifié par :

- la richesse du zeste en huiles essentielles par rapport aux autres parties du fruit (Robert et Lobstein, 2005) ;
- la capacité de ces huiles à piéger les radicaux libres (activité antioxydante) (Padrini et Lucheroni, 1996) ;
- la possibilité de valorisation d'un sous produit agricole par son incorporation comme additif alimentaire naturel et moins coûteux à la production de la margarine en substitution à un additif synthétique et coûteux.

#### **I-1- Collecte du fruit**

La récolte du citron a été effectuée à la fin de mois de mars 2010 le soir au niveau de la région de Sidi Mabrouk Supérieur de la wilaya de Constantine-Algérie.

L'Euréka est la variété du citron qui a servi à notre étude, cela est justifié par son abondance par rapport aux autres variétés existant en Algérie. De 1990 à 2009, la production moyenne du citron est de 112,1Qx/Ha sur 526,6Qx/Ha de la production totale des agrumes (DSA, Algérie).

Le fruit utilisé se caractérise par une forme ovale, de couleur jaune verdâtre, l'écorce est molle, moyennement fine, son épaisseur est d'environ 2mm d'épaisseur. Le poids moyen d'un fruit du citron employé est de 200g et le poids moyen de son zeste est de 33g.

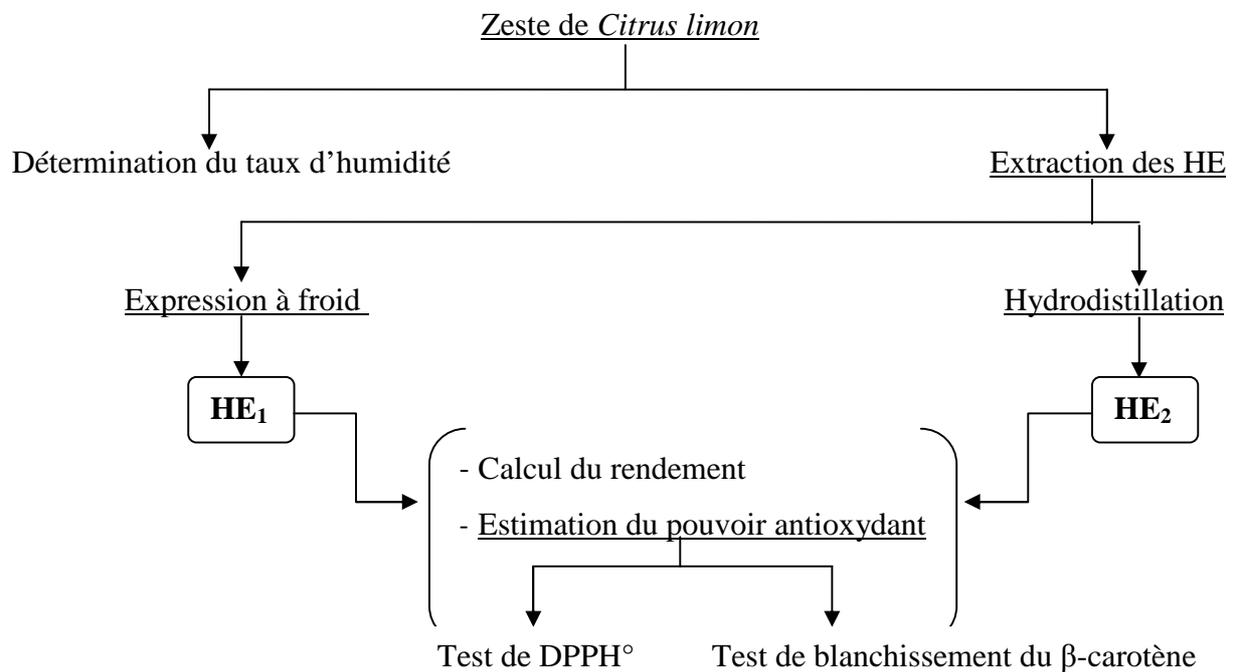
Le citron ainsi utilisé pour l'extraction des huiles essentielles a préalablement subi un lavage, une élimination des taches et un essuyage.

La partie pratique est subdivisée en deux principaux volets (Figure 3) :

- le premier traite les huiles essentielles, la réalisation de ce volet a été effectuée du 22 mars au 4 avril 2010 au niveau des laboratoires de l'INATAA-Constantine ;
- le deuxième traite l'élaboration des margarines et leurs analyses, la réalisation de ce volet a été effectuée du 11 avril au 13 octobre 2010 au niveau de Cévital-Béjaia.

Toutes les analyses effectuées sont reproduites trois fois.

**Partie I : Huiles essentielles**



**Partie II : Elaboration des margarines**

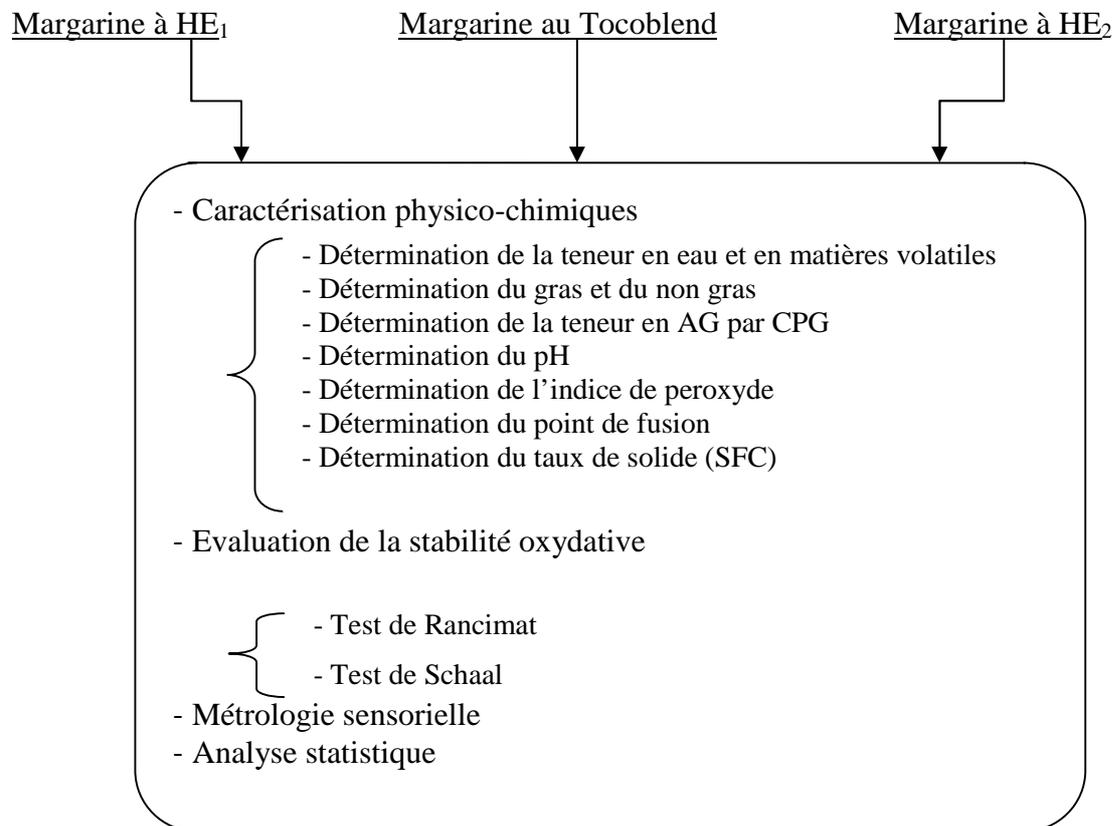


Figure 3. Enchaînement des différentes étapes de la partie pratique

## **I-2- Détermination de taux d'humidité**

- **Principe**

La teneur en eau de zeste de citron a été déterminée par le procédé de séchage à l'étuve à 105°C. (Twidwell *et al.*, 2002 ; Simpson, 1999).

- **Expression des résultats**

Le taux d'humidité (H %) est calculé par la formule suivante :

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

Où **H%** : Taux d'humidité en %

**M<sub>1</sub>** : Masse de la capsule + matière fraîche avant séchage en g ;

**M<sub>2</sub>** : Masse de l'ensemble après séchage en g ;

**P** : Masse de la prise d'essai en g.

## **II- Huiles essentielles**

### **II-1- Procédés d'extraction**

L'extraction des huiles essentielles à partir du zeste de citron frais est effectuée par :

- expression à froid
- hydrodistillation.

#### **II-1-1- Expression à froid**

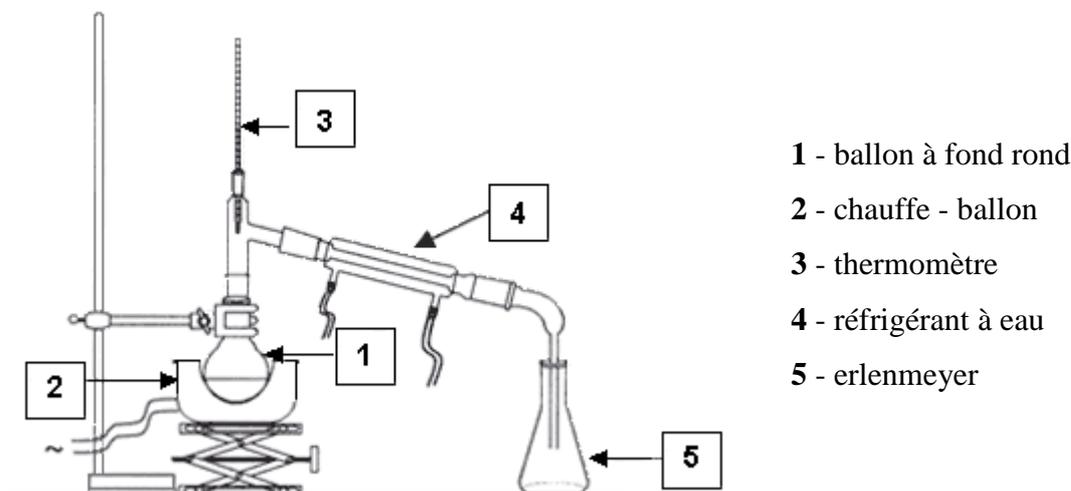
100g de zeste frais du citron sont broyés à l'aide d'un mixeur. Le broyat obtenu est mis dans un erlenmeyer avec 250 ml d'eau puis agité par un agitateur électrique de 10 à 15 mn.

L'eau et l'huile obtenue se séparent dans une ampoule à décanter par le procédé physique (différence de densité) (Peyron et Richard, 1992 ; Werner, 2002), l'huile obtenue est codée **HE<sub>1</sub>**.

#### **II-1-2- Hydrodistillation**

100 g de zeste frais du citron râpés sont introduits dans un ballon de 2 litres imprégnés d'eau distillée. L'ensemble est porté à l'ébullition pendant 2 à 3 heures (Figure 4).

Les vapeurs, entraînant avec elles l'huile essentielle, se condensent en traversant le réfrigérant et chutent dans une ampoule à décanter. Dans cette dernière, l'eau et l'huile se séparent par différence de densité (Peyron et Richard, 1992), l'huile obtenue est codée **HE<sub>2</sub>**.



**Figure 4.** Schéma général d'un hydrodistillateur

L'huile séparée de l'eau dans les deux cas est déshydratée par le sulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) et conservée à 4°C dans des flacons en verre emballés avec du papier aluminium.

## II-2- Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids du zeste utilisé (Carée, 1953. *In* Mohammedi, 2006).

Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$$\mathbf{R\% = P_1 / P_2 \times 100}$$

Où **R%** : rendement de l'huile en pourcentage ;

**P<sub>1</sub>** : poids de l'huile en g ;

**P<sub>2</sub>** : poids de zeste du citron en g.

## II-3- Cinétique d'extraction de l'HE<sub>2</sub>

La cinétique d'extraction consiste à déterminer le rendement en fonction du temps d'extraction. Elle a pour but de fixer le temps nécessaire pour extraire le maximum d'huile et pour éviter les pertes du temps et d'énergie (Bachelot *et al.*, 2006).

## **II-4- Test de mesure du pouvoir antioxydant**

La mise en évidence du pouvoir antioxydant de nos échantillons a été réalisée par deux tests chimiques ; mesure de l'activité de balayage d'un radical libre puissant DPPH° (2,2 diphényle-1-picrylhydrazyl) et la dégradation du β-carotène en présence de l'acide linoléique.

### **II-4-1-Test au DPPH**

- **Principe**

La réduction du radical libre DPPH° par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV-visible, en mesurant la diminution de l'absorbance à 517nm provoquée par des antioxydants (Molyneux, 2004).

- **Mode opératoire**

Selon le protocole de Mansouri *et al.* (2005), la solution de DPPH est préparée par la solubilisation de 2,4 mg de DPPH° dans 100 ml de méthanol. 25µl de chaque solution en huile essentielle à tester sont ajoutés à 975µl de la solution de DPPH°, le mélange est laissé à l'obscurité. Après 30 min, la décoloration des mélanges par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH° est mesurée à 517 nm, nous procédons de la même manière pour l'antioxydant de référence ; Tocoblend (Annexe 2).

Selon Yildirims *et al.* (2001) In Avlessi *et al.*, 2004, l'activité antiradicalaire (pourcentage d'inhibition) est estimée selon la formule suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire \%} = \frac{(\text{Abs}_{517} \text{ contrôle négatif} - \text{Abs}_{517} \text{ échantillon})}{\text{Abs}_{517} \text{ contrôle négatif}} \times 100$$

**Abs<sub>517</sub>** : absorbance lue à 517 nm

Le pourcentage d'inhibition permet de calculer le paramètre EC50 « Efficient Concentration ». Ce paramètre a été introduit par Brand-Williams et ses collaborateurs et a été ensuite employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats (Yoshida *et al.*, 1989. In Mighri *et al.*, 2010 ; Santiago *et al.*, 1992, Siripriya *et al.*, 1996 ; Bondet *et al.*, 1997 ; Wettasinghe et Shahidi, 2000. In Wanasundara et Shahidi, 2005.). Il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH°

(Molyneux, 2004). Ces EC50 sont déterminées graphiquement par la droite de régression dont l'abscisse représente la concentration des échantillons et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage. Le pouvoir antiradicalaire relatif (APR) est inversement proportionnel à l'EC50 ( $APR = 1/EC50$ ) (Prakash *et al.*, 2007).

#### **II-4-2- Test de blanchissement du $\beta$ -carotène**

- **Principe**

L'activité antioxydante des échantillons est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative du  $\beta$ -carotène par les produits d'oxydation de l'acide linoléique (Miller, 1971. In Avlessi *et al.*, 2004 ; Wanasundara *et al.*, 1994).

- **Mode opératoire**

Selon Kartal *et al.* (2007), 0,5 mg de  $\beta$ -carotène sont dissous dans 1ml de chloroforme et additionnés à 200 mg de Tween 40 et 25  $\mu$ l d'acide linoléique. Cette solution est évaporée au rotavapeur jusqu'à disparition de l'odeur du chloroforme, par la suite 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés, l'émulsion résultante est agitée vigoureusement. 350  $\mu$ l de solution d'huiles ou d'antioxydant de référence (Tocoblend) solubilisée dans du méthanol (2 mg/ml) sont additionnés à 2,5 ml de l'émulsion précédente.

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant (contrôle négatif dans lequel l'échantillon est remplacé par 350 $\mu$ l de méthanol) est suivie à 490 nm à des intervalles de temps réguliers pendant 48 heures. L'activité antioxydante relative des échantillons (AAR) est calculée selon l'équation suivante :

$$AAR = \text{Abs}_{t=48h} (\text{échantillon}) / \text{Abs}_{t=0} (\text{échantillon})$$

**AAR** : activité antioxydante relative

**Abs<sub>t=48h</sub>** : absorbance lue à 490nm après 48h.

### III- Elaboration de la margarine témoin et des margarines à huiles essentielles (HE<sub>1</sub>, HE<sub>2</sub>)

#### III- 1- Formulation

Les recettes générales de la margarine témoin (au Tocoblend) et de celles à huiles essentielles HE<sub>1</sub> et HE<sub>2</sub> sont données dans le tableau 1.

La quantité de quelques constituants n'est pas mentionnée, cela est dû aux secrets professionnels particuliers du Cévital.

**Tableau 1.** Recette de la margarine témoin et des margarines à huiles essentielles de *Citrus limon* (HE<sub>1</sub>, HE<sub>2</sub>)

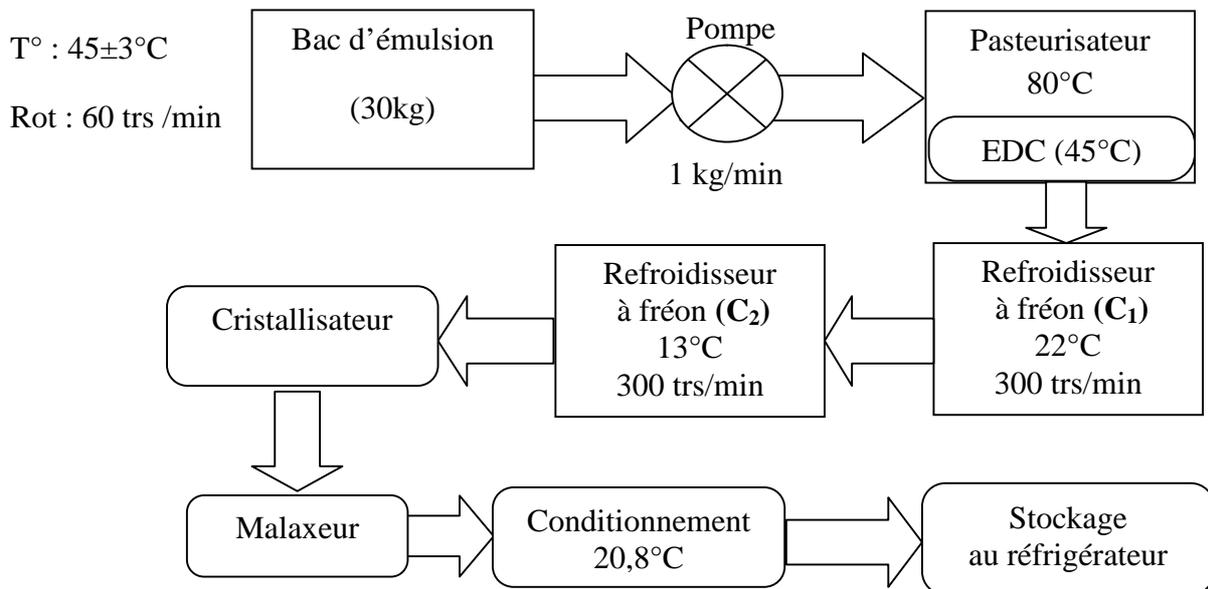
Matière première	Composition		
	Margarine au tocoblend	Margarine à HE <sub>1</sub>	Margarine à HE <sub>2</sub>
<b>Phase grasse</b>			
Huile de tournesol	X		
Huile de palme	X		
HPO	X		
HCNO	X		
<b>Ingrédients liposolubles</b>			
Monoglycéride lactique	0,4%		
B-carotène	7 ppm		
Arome de beurre	0,8g/kg		
Tocoblend	<b>100 ppm</b>	0	0
Huile essentielle (HE <sub>1</sub> )	0	<b>100 ppm</b>	0
Huile essentielle (HE <sub>2</sub> )	0	0	<b>100 ppm</b>
<b>Phase aqueuse</b>			
Eau	16%		
Lait	0,4%		
<b>Ingrédients hydrosolubles</b>			
Sel	0,3%		
Acide lactique	0,5g/kg		
Sorbate de potassium	1,3g/kg		

X : signifie la quantité non mentionnée de constituant correspondant

### III- 2- Procédé de fabrication

La fabrication des margarines est réalisée dans la chaîne pilote (Annexe 3), dont nous avons essayé de donner un schéma explicatif des différentes étapes de fabrication avec leurs paramètres (Figure 5). Après le dosage des deux phases et leurs ingrédients, on les verse dans le bac d'émulsification où se déroule l'opération d'émulsification. A ce stade, la stabilité de l'émulsion est incomplète, elle fait appel donc à une cristallisation. Néanmoins, une autre étape intermédiaire est obligatoire, c'est la pasteurisation. Elle se fait par chauffage à 80°C pendant 3 à 4 secondes sous pression de vapeur de 3 bars, puis un refroidissement de 45°C par la circulation d'eau afin d'éviter un choc thermique. L'émulsion, ainsi produite, atteint une température de 22°C et de 13°C en passant dans un premier puis un deuxième cylindre de refroidissement à fréon respectivement. La stabilité finale du produit est obtenue par la cristallisation. L'émulsion cristallisée est acheminée par la trémie jusqu'au malaxeur. Cet appareil va désaérer et malaxer le mélange en lui donnant consistance, souplesse et homogénéité.

Les margarines ainsi produites ont une température de 20,8°C et sont conditionnées dans des barquettes en plastique et stockées au réfrigérateur à une température de réfrigération (9-10°C).



C<sub>1</sub> : premier cylindre de refroidissement  
 C<sub>2</sub> : deuxième cylindre de refroidissement  
 EDC : échangeur de chaleur

**Figure 5.** Procédé de la fabrication de la margarine dans la chaîne pilote

Les margarines élaborées feront l'objet d'une caractérisation physico-chimique, de test de Schaal et de test de Rancimat pour apprécier leur résistance à l'oxydation.

Une margarine sans Tocoblend et sans huiles essentielles est élaborée en parallèle afin de servir de témoin négatif des tests de résistance à l'oxydation.

#### **IV- Caractérisation physico-chimique des margarines**

##### **IV-1- Détermination de la teneur en eau et des matières volatiles (Wolff, 1968)**

- **Principe**

Le principe est basé sur la perte à l'étuve à 105°C de la margarine mélangée avec du sable.

- **Mode opératoire**

- Peser 5 g de margarine dans une capsule contenant 20 g de sable purifié ;
- Introduire la capsule et son contenu dans une étuve réglée à 105 °C pendant 30 mn ;
- Sortir la capsule et la laisser refroidir dans un dessiccateur puis la peser ;
- Répéter l'opération (séchage, refroidissement et pesée), jusqu'à obtention d'un poids constant.

- **Expression des résultats**

La teneur en eau et en matières volatiles est déterminée par la formule suivante :

$$\text{Eau et matière volatiles \%} = \frac{P_1 \times 100}{P_2}$$

Soit  $P_1$  : perte de poids en g ;

$P_2$  : poids de la prise d'essai en g.

##### **IV-2- Détermination du gras et du non gras (Wolff, 1968)**

- **Principe**

Les deux parties grasses et non grasses sont séparées grâce à une extraction par solvant et leur poids est calculé après séchage à l'étuve réglée à 105°C.

- **Mode opératoire**

- Peser 5 à 10 g de margarine dans une capsule en porcelaine et porter le tout dans une étuve réglée à 105 °C pendant 1 heure ;
- Filtrer à travers un filtre préalablement séché et taré ;

- Laver le filtre avec une solution d'éther éthylique ;
- Porter le filtre dans une étuve à 105 °C pendant une demi-heure;
- Refroidir dans un dessiccateur puis peser ;
- Répéter l'opération jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

- **Expression des résultats**

La teneur en non gras exprimée en % est donnée par la formule suivante:

$$\text{NG \%} = \frac{P_2 - P_1}{P} \times 100 + \% \text{ eau}$$

Soit **NG (%)** : teneur de non gras en %

**P<sub>1</sub>** : Poids du filtre vide en g ;

**P<sub>2</sub>** : Poids du filtre avec le résidu en g ;

**P** : Masse de la prise d'essai en g.

La teneur en gras exprimée en % est donnée par la formule suivante:

$$\text{G \%} = 100 - \% \text{ NG}$$

**NG (%)** : teneur de non gras en %

**G (%)** : teneur de gras en %

#### **IV-3- Détermination de la teneur en acides gras par CPG (NF EN ISO 5508, 1995)**

- **Principe**

La chromatographie directe des corps gras n'est pas toujours possible en raison de :

- leurs températures d'ébullition trop élevées ;
- leurs instabilités thermiques.

La transformation chimique des acides gras constituant le corps gras en esters méthyliques permet d'abaisser leurs températures d'ébullition et d'obtenir des dérivés thermostables.

- **Mode opératoire**

- **Obtention des esters méthyliques par la méthode directe (NF EN ISO 5509, 2000)**

- Peser 0,5 g de corps gras ;
- Dissoudre dans 5ml d'hexane ;
- Ajouter 0,5ml de solution KOH méthanolique (1,3g dans 10ml de méthanol) ;
- Agiter 30 secondes ;

- Faire la centrifugation à 3000 trs/min pendant 5minutes ;
- Prélever avec une pipette Pasteur 1 à 2 gouttes de surnageant ;
- Ajouter 1ml d'hexane puis injecter.

➤ **Conditions d'injection**

- Détecteur FID ;
- Gaz vecteur ; N<sub>2</sub> avec un débit de 45ml/mn
- Température de l'injecteur : 250 °C ;
- Débit de H<sub>2</sub>: 40ml/mn ;
- Débit d'air : 450ml/mn

• **Expression des résultats**

Les acides gras sont identifiés par leurs temps de rétention par rapport à un chromatogramme de référence d'un mélange standard d'esters méthyliques de composition et concentration connues.

**IV-4- Détermination du pH** (AFNOR, 1982)

• **Principe**

Le pH est déterminé directement sur la phase aqueuse, après sa séparation du produit, à l'aide d'un pH-mètre.

**IV-5- Détermination de l'indice de peroxyde** (AOCS, 1987. *In* Laia et *al.*, 2000)

• **Principe**

Le principe repose sur le traitement d'une prise d'essai en solution dans un mélange d'acide acétique et de chloroforme, par une solution d'iodure de potassium (KI). L'iode libéré est titré par la solution de thiosulfate de sodium (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) en présence d'amidon comme indicateur de couleur.

• **Mode opératoire**

- Peser 3 g de margarine dans une fiole conique de 250 ml ;
- Ajouter 10 ml d'alcool éthylique et dissoudre le corps gras ;
- Ajouter 20 ml d'acide acétique et 1 ml de solution d'iodure de potassium ;
- Boucher aussitôt la fiole; agiter énergiquement pendant 1 mn et laisser à l'abri de la lumière pendant 5 mn ;
- Rincer le bouchon avec de petites quantités d'eau distillée ;

- Titrer la solution par le thiosulfate de sodium à 0.01N jusqu'à apparition d'une coloration jaune pâle ;
- Ajouter 1ml de solution d'amidon (la coloration devient bleu) et continuer le titrage jusqu'à décoloration totale ;
- Faire parallèlement un essai à blanc dans les mêmes conditions mais sans le corps gras.
- **Expression des résultats**

L'indice de peroxyde en milliéquivalent d'O<sub>2</sub>/kg est calculé selon l'équation :

$$\text{Indice de peroxyde} = \frac{V - V_0}{P} \times 1000$$

Où :

**V** : est le volume de thiosulfate de Na de l'échantillon ;

**V<sub>0</sub>** : est le volume requis pour titrer le blanc ;

**P** : est la prise d'essai en grammes.

#### **IV-6- Détermination du point de fusion** (AOCS, 1997. In Soares et al., 2009)

- **Principe**

Le principe repose sur le chauffage d'un tube capillaire contenant une prise d'essai de la margarine dans un bain marie et la notation de la température de fusion.

- **Mode opératoire**

- Introduire un tube capillaire propre, dans l'échantillon de margarine et le remplir sur une hauteur de 2 cm ;
- Refroidir le tube capillaire et son contenu au congélateur pendant 20 mn ;
- Attacher ce tube à un thermomètre et introduire l'ensemble dans un bêcher contenant de l'eau ayant une température inférieure de 10 °C environ de la température de fusion présumée ;
- Chauffer le bêcher de façon que la température s'élève d'environ 0.5 °C par minute, en surveillant le moment où le corps gras commence à monter dans le tube capillaire ;
- Lire cette température.

#### **IV-7- Détermination de taux de solide SFC (Solid Fat Content) (Wolff, 1968)**

- **Principe**

Consiste à déterminer le taux de solide dans la matière grasse à une certaine température, réalisé par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire). Ce taux exprimé en pourcentage, constitue une caractéristique physique importante influençant beaucoup les propriétés technologiques et sensorielles des corps gras : la texture.

- **Mode opératoire**

- Faire fondre la margarine dans un bêcher à 70°C ;
- filtrer sur un papier filtre préalablement séché ;
- remplir trois tubes propres et secs à 2cm et les mettre dans un bain marie : 15 mn à 100°C ; 05 mn à 60°C ; 60 mn à 0°C respectivement ;
- placer les tubes dans l'appareil RMN et lire la première valeur en % à 5 °C ;
- réchauffer les tubes dans le bain marie 30 mn à 10°C (2<sup>ème</sup> lecture), puis 30 mn à 15°C (3<sup>ème</sup> lecture) ;
- noter les valeurs de SFC chaque 30mn à des températures différentes. Ensuite tracer la courbe de SFC (%) en fonction de la température (°C).

#### **V- Evaluation de la stabilité oxydative de la margarine**

##### **V-1- Test de Rancimat**

Le test au Rancimat a été reconnu comme une méthode officielle à l'échelle internationale (Norme ISO 6886) et par de nombreux pays tels que les Etats-Unis d'Amérique, le Japon et la Suisse (ISO 6886, 2006 ; Rahmani, 2007).

- **Principe**

Passage d'un courant d'air purifié à travers l'échantillon porté à une température spécifiée. Les gaz dégagés au cours du processus d'oxydation sont entraînés par l'air dans une fiole contenant de l'eau distillée dans laquelle est immergée une électrode de mesure de la conductivité. L'électrode est connectée à un dispositif de mesure de l'enregistrement. La fin de la période d'induction est indiquée lorsque la conductivité se met à augmenter rapidement. Cette augmentation accélérée est provoquée par l'accumulation d'acides gras volatils produits au cours de l'oxydation (ISO 6886, 2006) (Annexe 4). Le test au Rancimat offre l'avantage de suivre plusieurs échantillons en parallèle, avec des durées d'analyse réduites (Aparicio *et al.*, 1999).

Cependant, de part les conditions drastiques d'oxydation (haute température, bullage intensif d'air), cette méthode ne permet pas de déterminer la stabilité des corps gras à température ambiante mais elle permet de comparer l'efficacité des antioxydants ajoutés aux corps gras (Judde, 2004 ; Benakmoum *et al.*, 2008).

- **Mode opératoire**

- Monter l'appareillage conformément à la figure 6 ;
- Fixer la pompe à membrane pour gaz et régler le débit à 20l/h ;
- Amener le bloc chauffant à la température voulue (en général 100- 120°C) à l'aide d'un thyristor et du thermomètre à contact ou à l'aide d'un régulateur électronique. La température doit être maintenue constante à  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$  près pendant la durée d'essai ;
- Remplir les cellules de mesure de 50 ml d'eau distillée à l'aide d'une pipette de mesure ;
- A l'aide d'une pipette, peser, à 0,01g près, 3g de l'échantillon conditionné et les introduire dans le flacon d'oxydation à l'air.
- Mettre en marche la pompe à membrane pour gaz. Relier le tube d'arrivée et le tube de sortie d'air aux flacons d'oxydation à l'air et aux cellules de mesure à l'aide des tubes de raccordement ;
- Introduire le flacon d'oxydation à l'air muni de son bouchon hermétique dans le trou percé à cet effet dans le bloc chauffant, qui doivent être tous deux à la température requise. Il convient de réaliser aussi vite que possible ces deux dernières étapes de préparation. Démarrer ensuite immédiatement l'enregistreur automatique des données ;
- Arrêter les mesurages au moment où le signal a atteint 100% de l'échelle de l'enregistreur, généralement 200 $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

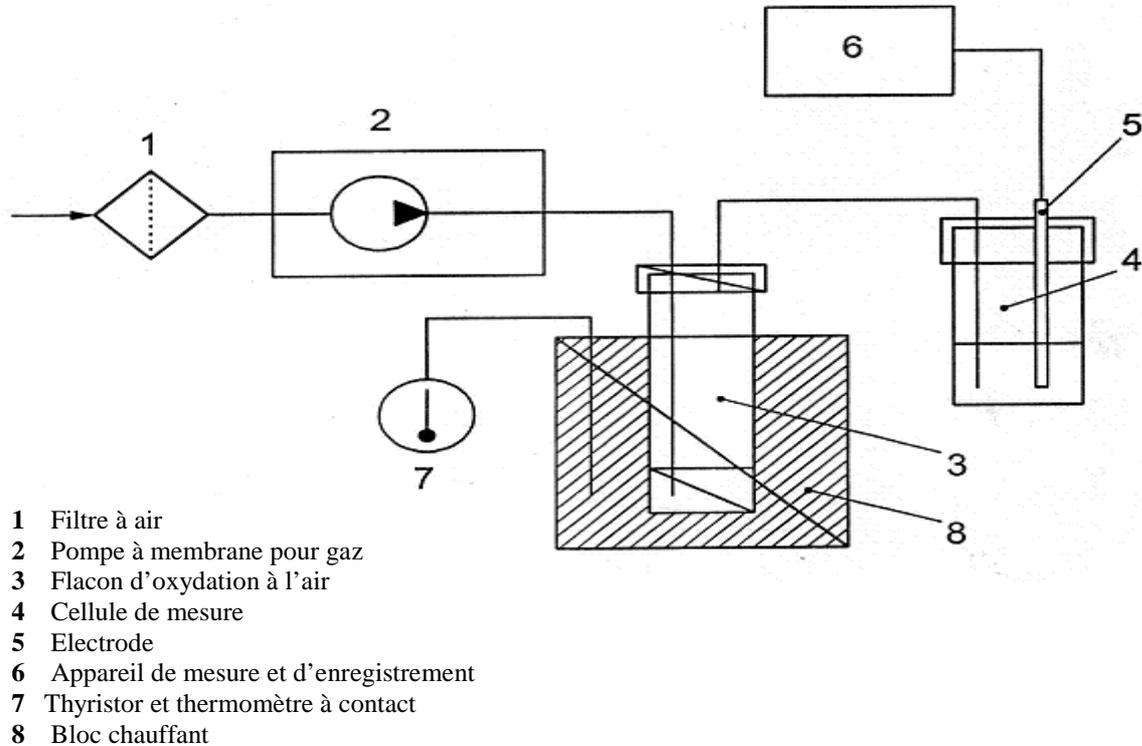
- **Expression des résultats**

Le matériel disponible dans le commerce permet un calcul automatique de la période d'induction, en utilisant le maximum de la seconde dérivée de la courbe.

Nous pouvons procéder à un calcul manuel en suivant les étapes suivantes :

- tracer la tangente optimale le long de la première partie modérément ascendante de la courbe ;
- tracer la tangente optimale le long du haut de la partie fortement ascendante de la courbe ;

- déterminer la stabilité à l'oxydation en relevant la durée correspondante au point d'intersection des deux droites (période d'induction) ;
- exprimer la stabilité à l'oxydation en heure, à 0,1h près.



**Figure 6.** Représentation schématique de l'appareillage du test de Rancimat (ISO 6886, 2006)

L'activité antioxydante relative est exprimée par le facteur de protection (pf), qui est calculé en divisant la période d'induction (PI) de la margarine contenant un des échantillons étudiés par la période d'induction de la margarine sans échantillons (Murcia *et al.*, 2002).

### **V-2- Méthode à l'étuve (Test de Schaal)**

Le test consiste à oxyder la matière grasse dans une étuve à 30°C. La mise en évidence de l'oxydation est montrée par la mesure de l'indice de peroxyde sur des prélèvements faits une fois par semaine (Wolff, 1968). Cette méthode présente l'avantage de se rapprocher des conditions réelles de stockage (Anwar *et al.*, 2006. In Zidani, 2009).

### **VI- Métrologie sensorielle**

Les métrologies sensorielles connaissent, depuis une vingtaine d'années, un développement indiscutable. Ce développement est dû à la fois à une réflexion des industriels

de l'agroalimentaire qui veulent connaître les produits qu'ils mettent sur le marché et à une demande des entreprises de la grande distribution qui veulent s'assurer que les produits qu'ils commercialisent sous leur propres marques ont des caractéristiques qui les distinguent des (ou qui les font ressembler aux) produits leaders. Il a été soutenu par le progrès des connaissances et par l'offre de méthodes standardisées (Quannari *et al.*, 1997).

L'analyse sensorielle a pour but d'évoquer, mesurer, analyser et interpréter les caractéristiques d'un produit telles qu'elles sont perçues par les organes de sens (Meilgaard *et al.*, 1987 ; SSHA, 1998 ; ACTIA, 1999. In Daudin et Duby, 2002). A côté de cette analyse qui a un caractère analytique, il existe des épreuves à caractère hédonique dont la vocation est d'évaluer l'acceptabilité des produits et cerner les attentes des consommateurs. Ces dernières épreuves font appel à un panel de consommateurs (Daillant-Spinnler *et al.*, 1997). L'analyse sensorielle s'intéresse au produit pour lui-même, alors que l'analyse hédonique s'intéresse à la manière dont un produit est accepté par un groupe cible de consommateurs (Quannari *et al.*, 1997).

L'analyse a été faite par le personnel de la margarinerie de Cévital dont deux sont spécialistes au service marketing, ils contrôlent chaque début de semaine les produits élaborés, deux travaillent dans le laboratoire de recherche et développement du même service ; ils sont responsables de la formulation des recettes, et le reste (21 sujets) travaille dans la filiale de la margarinerie. En parallèle, nous avons réalisé les épreuves à caractère hédonique en utilisant 09 échelles de notation (01 : Extrêmement désagréable et 09 : Extrêmement agréable) dans lesquelles les assesseurs ont évalué les différents caractéristiques: odeur, couleur, texture et goût (Annexe 5 et 6).

## **VII- Analyse statistique**

Les résultats d'analyse sont exprimés par des moyennes plus ou moins écarts type. Les calculs sont faits à l'aide de logiciel Excel version 2007. Les valeurs de EC50 (concentration efficace à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition =  $f$ (concentrations)].

Les résultats ont été comparés par le test ANOVA et le test Student avec un seuil de signification  $\alpha = 0,05$ .

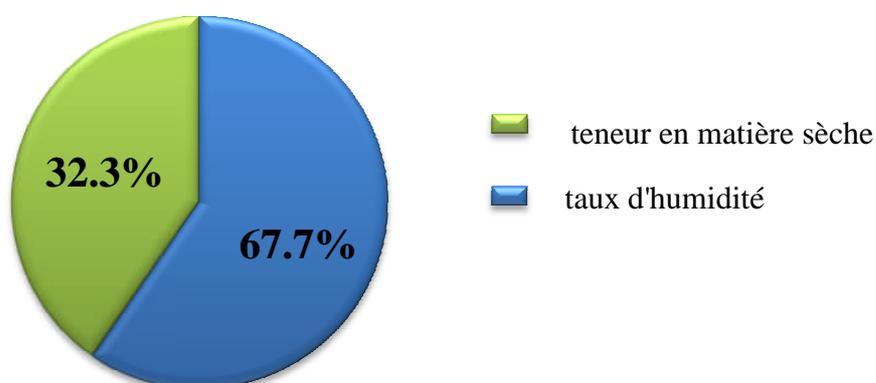
RESULTATS  
ET  
DISCUSSION

## RESULTATS ET DISCUSSION

### 1-Taux d'humidité

Les végétaux sont connus par leur richesse en eau, elle présente une partie majoritaire de leur composition.

Les analyses du zeste de *Citrus limon* ont révélé un taux d'humidité important  $67,7 \% \pm 1,153\%$ . Cela signifie plus de la moitié du poids de zeste frais de citron est constituée par l'eau. Le reste représente la matière sèche (Figure 7).



**Figure 7.** Taux d'humidité de zeste du citron

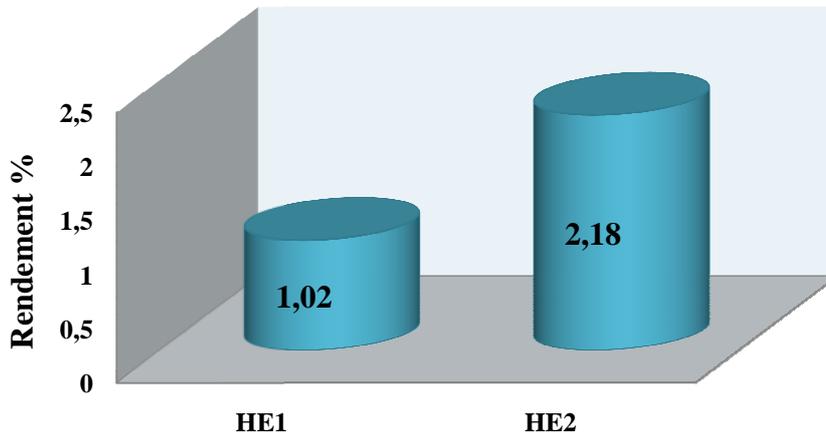
### 2- Rendement d'extraction en huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été extraites par expression à froid (HE<sub>1</sub>) et par hydrodistillation (HE<sub>2</sub>). En se référant à la bibliographie, en plus de l'origine de la plante, le mode d'extraction influe sur le rendement en huile essentielle (Laurent et Delerme, 2008).

Le rendement en HE<sub>1</sub> est moins important que le rendement en HE<sub>2</sub> équivalent respectivement à  $1,02\% \pm 0,036\%$  et  $2,18\% \pm 0,051\%$  (Figure 8). Au seuil  $\alpha = 0,05$ , les deux rendements présentent une différence significative, cela confirme que le mode d'extraction a un impact sur le rendement.

L'intervention de la chaleur dans l'extraction par hydrodistillation a facilité l'éclatement des poches sécrétrices ce qui explique cette différence en rendements (Bachelot *et al.*, 2006).

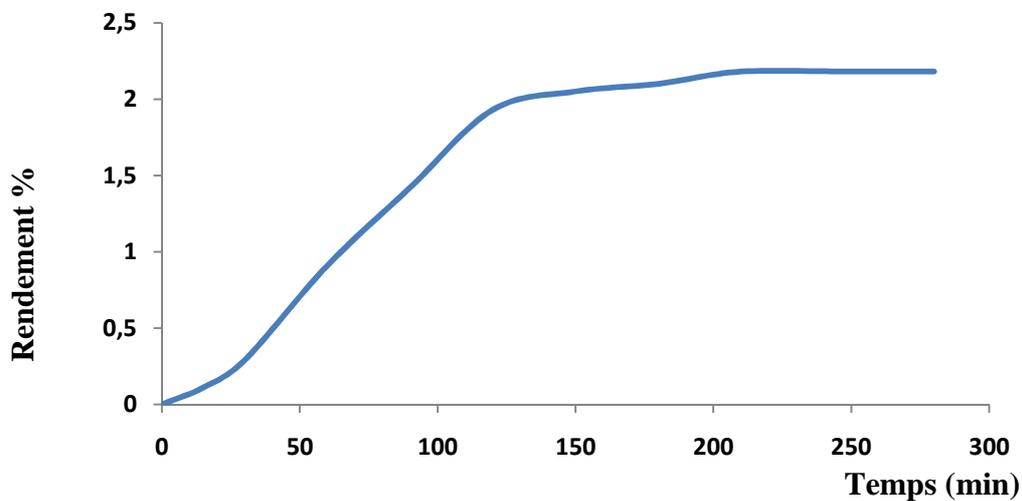
Donc du point de vue quantitatif, il est intéressant de procéder à l'extraction des huiles essentielles de citron par hydrodistillation



**Figure 8.** Rendement en huiles essentielles

### 3- Cinétique d'extraction de HE<sub>2</sub>

La cinétique d'extraction de l'huile essentielle de zeste de *Citrus limon* par hydrodistillation indique une augmentation du rendement en huile de  $0,11\% \pm 1,001\%$  à  $2,10\% \pm 0,891\%$  dans l'intervalle du temps de 15 à 180 minutes. Cette augmentation tend vers un palier de  $2,18\% \pm 0,051\%$  après 210 minutes  $\pm 1,54$  minutes (Figure 9).



**Figure 9.** Evolution du rendement en huile essentielle de zeste de citron extraite par hydrodistillation

A l'issu de ces résultats, il serait économiquement rentable de fixer la durée d'extraction de cette huile à 120 minutes (2 heures).

#### 4- Activité antioxydante des huiles extraites

##### 4-1-Effet Scavenger du radical DPPH

L'activité antioxydante de nos extraits exprime leur capacité à réduire les radicaux libres. Elle est étudiée par la méthode au DPPH, ce radical libre présente une coloration violet foncé, lorsqu'il est piégé par les antioxydants, il apparaît sous sa forme réduite de couleur jaune pâle (Figure 10) (Soares *et al.*, 1997 ; Molyneux, 2004).

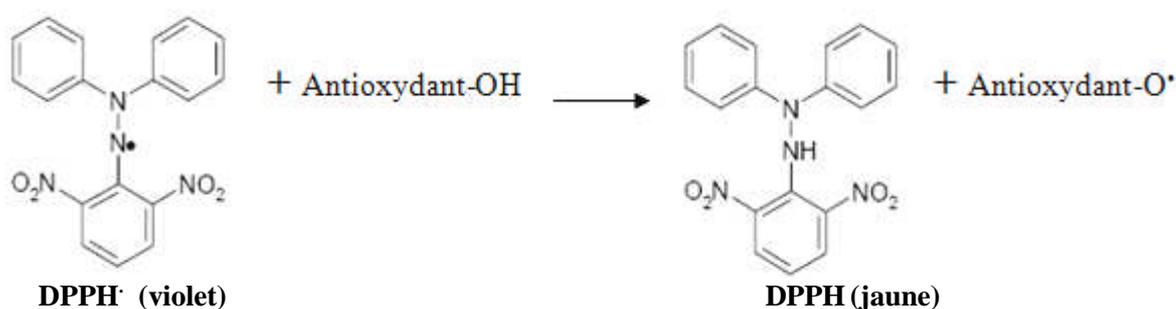


Figure 10. Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (Molyneux, 2004)

La mesure de l'absorbance (ou densité optique DO) est effectuée par spectrophotométrie à 517nm. A partir des valeurs obtenues, nous avons calculé les pourcentages d'inhibition qui sont représentés dans la figure 11.

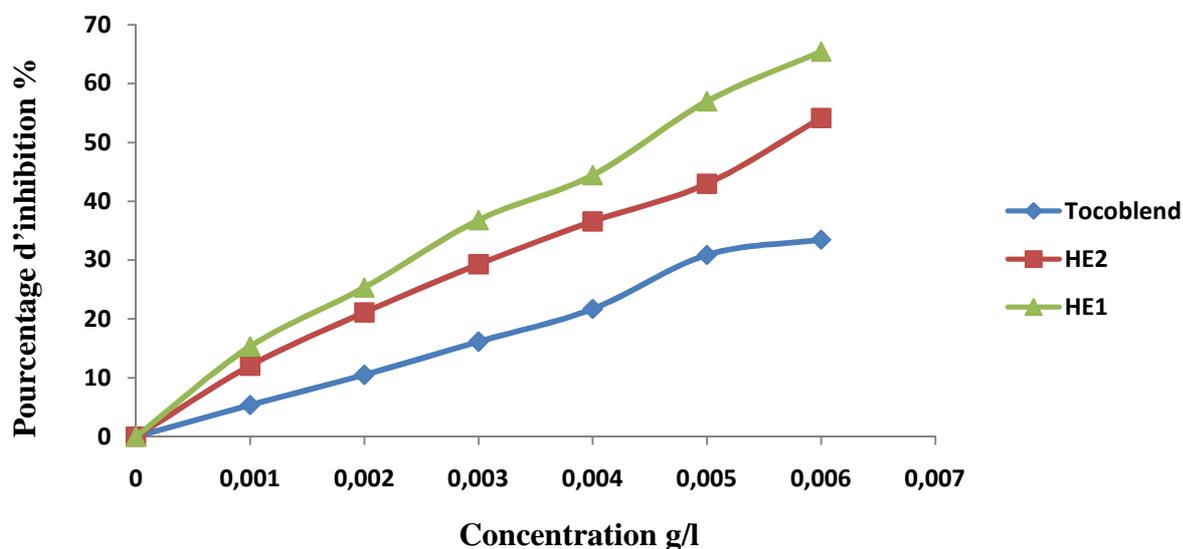


Figure 11. Variation du pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'HE<sub>1</sub>, de l'HE<sub>2</sub> et du Tocoblend.

La figure 11 représente la variation du pouvoir antioxydant en fonction de la concentration des huiles essentielles HE<sub>1</sub>, HE<sub>2</sub> ainsi que de celle du Tocoblend. Au seuil  $\alpha = 0.05$ , nous avons remarqué qu'il n'y a aucune différence significative d'effet antioxydant entre les trois échantillons pour la concentration  $\leq 0,002$  g/l, à partir de cette dernière et à une concentration de 0,003 g/l, nous avons remarqué une différence significative entre le Tocoblend et les deux huiles de *Citrus limon* qui elles ne présentent aucune différence significative. A une concentration  $\geq 0,005$  g/l, les trois échantillons se distinguent significativement avec des efficacités d'inhibition du radical DPPH différentes et importantes.

Le tableau 2 représente les concentrations efficaces du substrat qui causent la perte de 50% de l'activité de DPPH ainsi que l'activité antioxydante relative.

**Tableau 2.** Concentration efficace (EC50) et puissance antiradicalaire (ARP) des huiles essentielles de *Citrus limon* (HE<sub>1</sub>, HE<sub>2</sub>) et du Tocoblend du test au DPPH

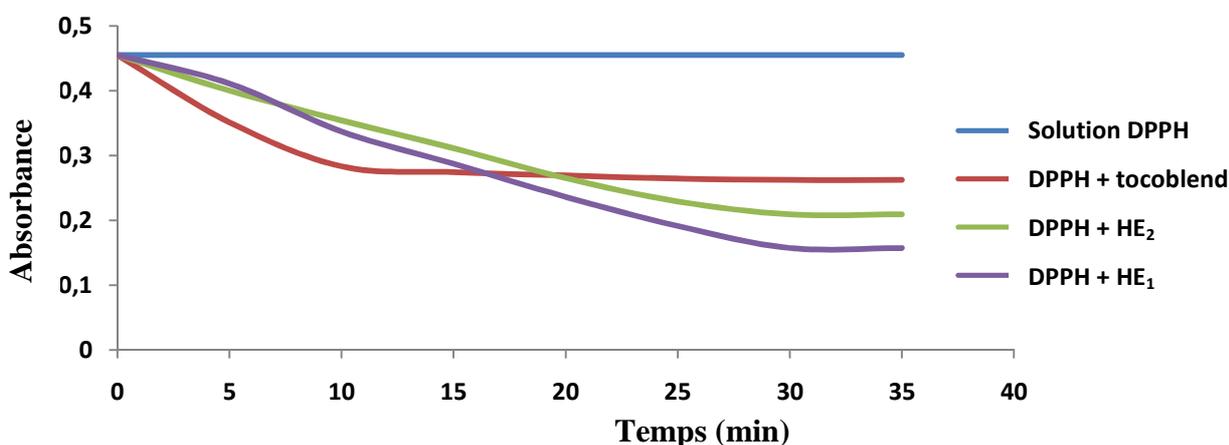
<b>Echantillon</b>	<b>EC 50 (g/l)</b>	<b>ARP</b>
<b>Tocoblend</b>	0,0082 $\pm$ 0,00036	121,95 $\pm$ 0,7993
<b>HE<sub>1</sub></b>	0,0044 $\pm$ 0,0007	227,27 $\pm$ 1,7301
<b>HE<sub>2</sub></b>	0,0054 $\pm$ 0,00047	185,185 $\pm$ 0,7468

Comme figurant dans le tableau 2, nos huiles essentielles sont des excellents antioxydants naturels. Elles possèdent des capacités de neutralisation de DPPH puissantes en les comparants à celle du Tocoblend. Elles agissent à de faibles doses. En suivant l'EC 50 la capacité de balayage de radical libre DPPH est classée dans l'ordre : HE<sub>1</sub> > HE<sub>2</sub> > Tocoblend.

En se basant sur les résultats de cette étude pour comparer les deux échantillons (HE<sub>1</sub>, HE<sub>2</sub>), on peut dire que l'huile extraite par hydrodistillation (intervention de la chaleur) a perdu quelques principes actifs donnant plus d'efficacité sur la neutralisation du radical DPPH.

#### 4-2- Cinétique de la réaction de réduction de DPPH

Pour se renseigner sur la vitesse de réduction du radical libre DPPH par le Tocoblend et les huiles essentielles de *Citrus limon* (HE<sub>1</sub>, HE<sub>2</sub>), nous avons réalisé un suivi de la réaction de réduction par mesure de l'abaissement de l'absorbance dans le temps (Figure 12). Nous avons remarqué que lorsqu'on additionne le Tocoblend à la solution de DPPH, l'absorbance du mélange diminue très rapidement vers une valeur basse de 0,262 et devient stable dans un laps de temps extrêmement court (près de 10 min), en la comparant à celle des huiles essentielles qui diminue lentement. Nous avons remarqué aussi que l'huile extraite par hydrodistillation (HE<sub>2</sub>) réduit plus rapidement le radical DPPH que l'huile essentielle extraite par expression à froid (HE<sub>1</sub>) mais avec une capacité moindre et une durée moins importante (près de 25min).



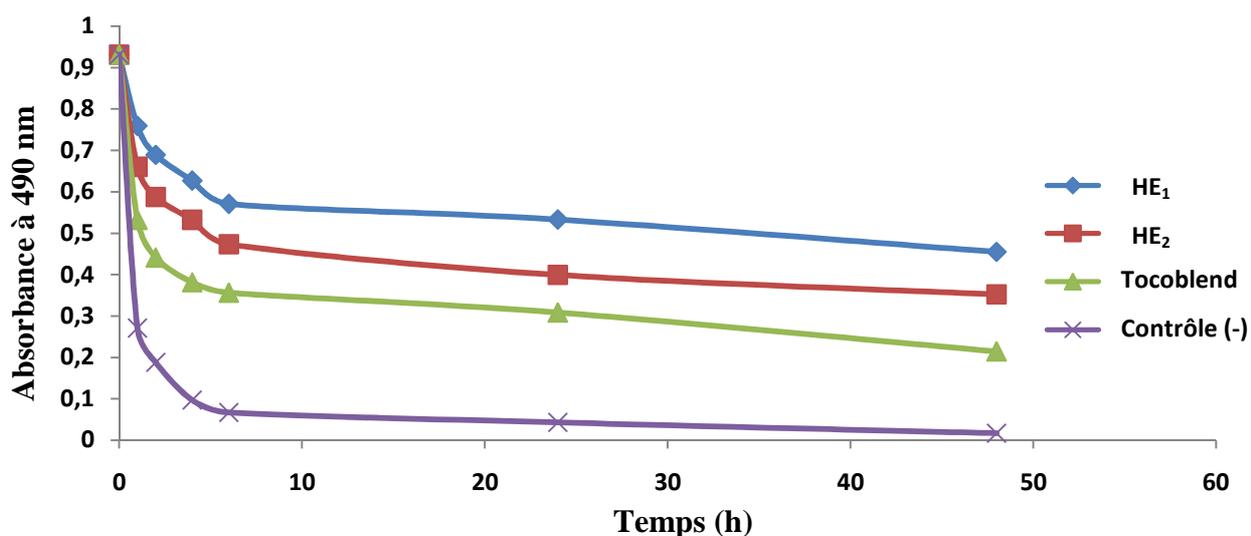
**Figure 12.** Cinétique de la réaction de réduction de DPPH par le Tocoblend et par les huiles essentielles du *Citrus limon*

En fonction des résultats obtenus, nous pouvons dire que le Tocoblend possède une activité antioxydante moins importante que celle des huiles essentielles de *Citrus limon* où l'activité sera davantage augmentée avec le temps. Au seuil 0,05, le DPPH neutralisé augmente de façon significative lorsqu'on prolonge le temps de contact ainsi que pour l'huile essentielle extraite par expression à froid et l'huile extraite par hydrodistillation que pour le Tocoblend.

#### 4-3-Test de blanchissement du $\beta$ -carotène

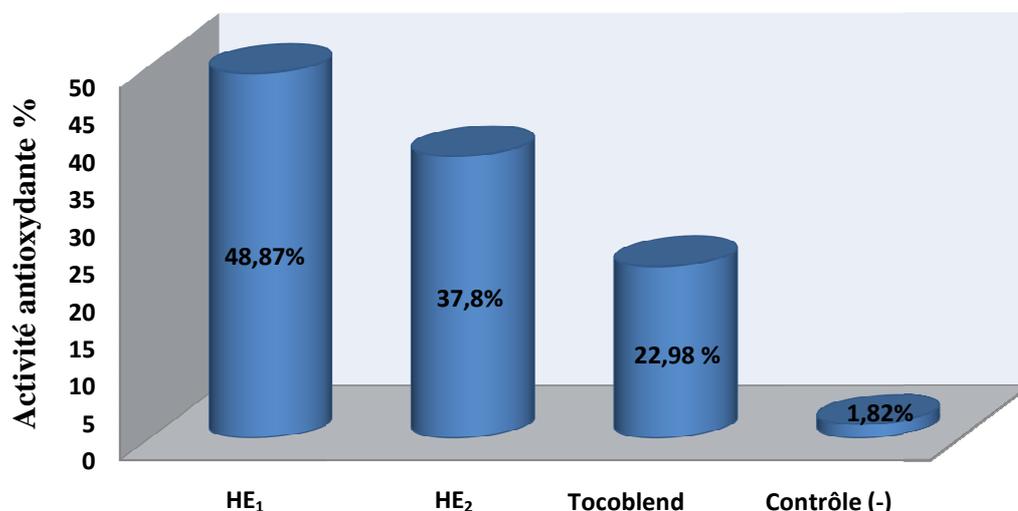
Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, suite à l'abstraction des atomes d'hydrogène à partir de groupements méthylènes diallyliques de

l'acide linoléique (Wanasundara *et al.*, 1994 In Mighri *et al.*, 2010). Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le  $\beta$ -carotène hautement insaturé entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie spectrophotométriquement à 490 nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du  $\beta$ -carotène. La cinétique de blanchissement du  $\beta$ -carotène en absence et en présence des huiles essentielles et du Tocoblend et les pouvoirs d'inhibition sont respectivement représentés dans les figures 13 et 14.



**Figure 13.** Cinétique de blanchissement du  $\beta$ -carotène à 490 nm en absence et en présence des antioxydants (Tocoblend, HE<sub>1</sub> et HE<sub>2</sub>).

D'après ces résultats, nous avons remarqué que le Tocoblend et les huiles essentielles testées inhibent d'une manière efficace l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du  $\beta$ -carotène par rapport au contrôle négatif qui représente plus de 98% de la peroxydation (Figure 14). Les deux huiles HE<sub>1</sub> et HE<sub>2</sub> montrent la plus grande activité inhibitrice par rapport à celle de Tocoblend. La différence d'efficacité d'inhibition des trois échantillons (Tocoblend, HE<sub>1</sub> et HE<sub>2</sub>) et de témoin négatif est apparue significative juste après la première heure. Cette différence n'est pas significative entre les deux huiles et le Tocoblend qu'à partir la cinquième heure. Après cinq heures et 46 minutes la différence entre les deux huiles essentielles de *Citrus limon* (HE<sub>1</sub> et HE<sub>2</sub>) est significative ( $\alpha = 0,05$ ).



**Figure 14.** Activité antioxydante des huiles essentielles de *Citrus limon* (HE<sub>1</sub>, HE<sub>2</sub>) et du Tocoblend

Un extrait qui retarde ou inhibe le blanchissement du  $\beta$ -carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant primaire (Liyana-Pathirana *et al.*, 2006). Selon plusieurs auteurs, le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du  $\beta$ -carotène, paraît très utile comme un modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques (Ferreria *et al.*, 2006).

Au seuil  $\alpha = 0.05$ , nous avons noté qu'il y a une efficacité significativement différente entre les deux huiles essentielles (HE<sub>1</sub>, HE<sub>2</sub>) et entre ces dernières et le Tocoblend.

**Tableau 3.** Concentration efficace (EC50) et puissance antiradicalaire (ARP) des huiles extraites (HE<sub>1</sub>, HE<sub>2</sub>) et du Tocoblend du test de blanchissement du  $\beta$ -carotène

Echantillon	EC 50 (g/l)	ARP
Tocoblend	0,0065 $\pm$ 0,00520	153,84 $\pm$ 0,0908
HE <sub>1</sub>	0,0031 $\pm$ 0,0302	322,58 $\pm$ 0,021
HE <sub>2</sub>	0,0047 $\pm$ 0,00122	212,76 $\pm$ 0,001

Le tableau 3 nous confirme les résultats précédents du test de neutralisation de DPPH concernant le classement de la capacité d'inhibition de l'oxydation (HE<sub>1</sub> > HE<sub>2</sub> > Tocoblend). Nous avons remarqué aussi que la puissance antiradicalaire relative de tous les échantillons

est plus importante dans ce test que le test de réduction de DPPH, cela est dû à la puissance élevée de ce dernier.

## 5- Caractérisation des margarines élaborées

### 5-1-Caractéristiques physicochimiques

Les résultats de la caractérisation physico-chimique des margarines élaborées (margarine avec le Tocoblend et margarines à huiles essentielles de *Citrus limon* HE<sub>1</sub>, HE<sub>2</sub>) sont représentés dans le tableau 4.

**Tableau 4.** Caractéristiques physico-chimiques des margarines élaborées

Paramètres	Teneurs		
	Margarine témoin	Margarine à HE <sub>1</sub>	Margarine à HE <sub>2</sub>
Teneur en eau et en matières volatiles (%)	15,72 ± 0,153	15,98 ± 0,098	16,02 ± 0,102
Teneur en non gras (%)	21,83 ± 0,046	21,70 ± 0,133	22,09 ± 1,011
Teneur en gras (%)	78,17 ± 1,270	78,30 ± 0,065	77,91 ± 0,009
pH	4,7 ± 0,001	4,8 ± 0,001	5 ± 0,002
Indice de peroxyde (meq/kg)	1,97 ± 0,019	1,89 ± 1,123	1,92 ± 1,141
Point de fusion (°C)	37 ± 0,001	37,2 ± 0,001	37 ± 0,001

La composition en matière grasse et en eau des margarines élaborées correspondent aux critères fixés en amont de leur fabrication, critères de type margarine à tartiner. L'indice de peroxyde rend compte de l'altération des corps gras par oxydation, inconvénient majeur touchant essentiellement les acides gras insaturés (AGI). Nos produits présentent un indice de peroxyde moyen de 1,90 ± 1,132 meq O<sub>2</sub>/kg, valeur inférieure à 5 méq/kg, maximum requis par les normes (Karleskind, 1992). Le point de fusion moyen obtenu est de 37 °C, correspond à celui choisi pour la recette retenue. Il doit être fixé de manière à ce que la margarine soit fondante dans la bouche mais aussi plastique à température ambiante pour supporter le travail mécanique lors de la tartinabilité.

Nous avons noté aussi que pour tous les paramètres physico-chimiques et au seuil  $\alpha = 0.05$ , aucune différence significative entre les trois margarines n'a été constatée.

### 5-2- Composition en acides gras des margarines élaborées

Le tableau 5 représente la composition en acides gras de l'une des trois margarines élaborées. Nous avons choisi au hasard la margarine à huile essentielle de *Citrus limon* extraite par expression à froid. Cela est justifié par la différence non significative de leurs compositions.

**Tableau 5.** Composition en acides gras de la margarine à HE<sub>1</sub>

Formule d'AG	Nom commun	Teneur en %
C8 : 0	Acide caprylique	0,388
C10 : 0	Acide caprique	0,373
C12 : 0	Acide laurique	5,117
C14 : 0	Acide myristique	2,258
C16 : 0	Acide palmitique	24,962
C18 : 0	Acide stéarique	2,991
C18 : 1	Acide oléique (n 9 cis oléique)	24,839
C18 : 1	Acide oléique (n 7 cis oléique)	0,632
C18 : 2	Acide linoléique	31,098
C18 : 3	Acide linoléique	0,000
C20 : 0	Acide arachidonique	0,317
C20 : 1	Acide eicosanoïque	0,000
C22 : 0	Acide béhénique	0,333
Autres non identifiés	/	6,686

La composition en acide gras reflète la teneur en acides gras des huiles végétales utilisées (huile de tournesol, huile de palme, huile de palme hydrogénée et huile de coprah hydrogénée). La présence des acides caprylique, caprique, laurique et myristique à des teneurs de 0.388, 0.373, 5.117 et 2.258% respectivement proviennent de l'huile de coprah. L'acide palmitique présente une teneur de 24.962 %, celle-ci provient de l'huile de palme entrant dans la recette de notre margarine.

L'huile de palme renferme des teneurs importantes en acides stéarique, oléique, linoléique, et des traces de l'acide linoléique. L'acide oléique s'avère avec une teneur importante (25.471%) dans notre margarine. De récentes études ont démontré que les régimes alimentaires riches en acide oléique sont associés à une diminution des LDL-cholestérol dans le plasma sanguin, et peuvent réduire donc, l'incidence des maladies cardiovasculaires (Anwar *et al.*, 2006 In Zidani, 2009).

L'acide linoléique est l'acide prédominant avec une teneur de 31.098 %, ce paramètre est important dans classification des margarines. Selon Ovesen *et al.* (1998) et Karabulut et Turan (2006), les margarines peuvent être classées en trois catégories en fonction de leur teneur en acide linoléique :

- les margarines hard (dures) contenant moins de 20 % d'acide linoléique ;
- les margarines semi soft (demi-molles) contenant 20 à 40 % d'acide linoléique ;
- les margarines soft (molles) contenant plus de 40 % d'acide linoléique.

En se référant à cette classification, notre margarine est dite demi-molle.

Les *trans* isomères des C<sub>18:1</sub>, C<sub>18:2</sub> et C<sub>18:3</sub> sont un effet indésirable de l'hydrogénation, ils ne sont pas mis en évidence dans cette analyse. Ceci est dû aux conditions de l'analyse par CPG qui ne sont pas appropriées à leur séparation et identification.

Le tableau 6 récapitule des teneurs comparées en différentes classes d'acides gras.

**Tableau 6.** Teneurs comparées en différentes classes d'acides gras (en %) de la margarine à huile essentielle de *Citrus limon* extraite par expression à froid

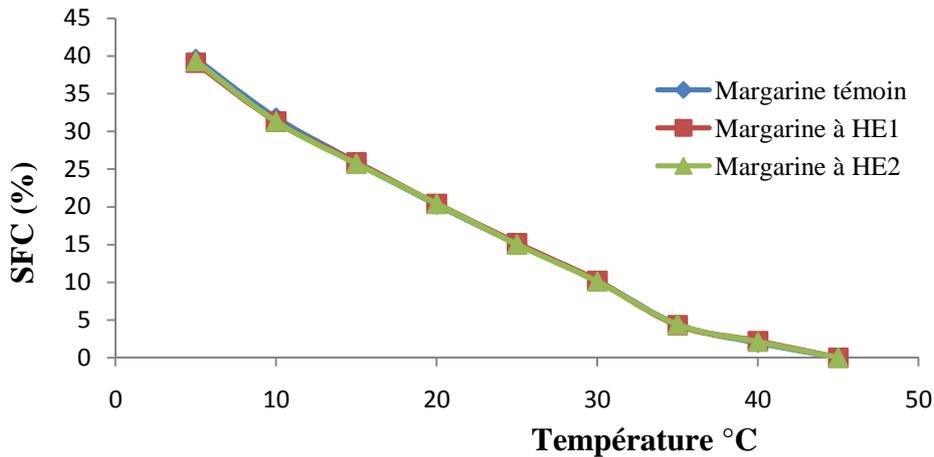
Classe d'acides gras	Teneur en %
AGS	36,422
AGMI	25,471
AGPI	31,098
AGI	56,569
AGI/AGS	1,553

La margarine ainsi analysée (à HE<sub>1</sub>) contient 56.569 % d'acides gras insaturés (AGI) dont 25.471 % sont des acides gras monoinsaturés (AGMI) et 31.098 % sont des acides gras polyinsaturés (AGPI). Cette composition apporte les acides gras essentiels (AGE).

Le rapport AGPI/AGS de notre margarine est de 0.85, il est conforme aux recommandations des nutritionnistes qui est de l'ordre de 0.8 (Karleskind, 1992).

### 5-3-Analyse de la texture par RMN (SFC)

L'indice SFC se rapporte au pourcentage des matières grasses qui sont solides à des températures différentes. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 15.



**Figure 15.** Indice SFC de la margarine témoin et des margarines à huiles essentielles de *Citrus limon* (HE<sub>1</sub>, HE<sub>2</sub>)

Le SFC est un facteur essentiel à déterminer car il est responsable de plusieurs caractéristiques du produit, y compris son aspect général, exsudation d'huile et propriétés organoleptiques (Noor Lida *et al.*, 2002). Pour les margarines à tartiner, le SFC ne doit pas dépasser 40% à 5°C et pas plus de 6% à 37°C (De Greyt et Huyghebaert, 1993) ou pas plus de 32% à 10°C (Charteris et Keogh, 1991).

D'après les résultats obtenus, nous pouvons dire que les margarines élaborées sont plastiques et faciles à tartiner. À 37 °C, l'indice de SFC est inférieur à 6% et donc les margarines fondent facilement dans la bouche. Aussi, il faut noter qu'à 95% il n'y a aucune différence significative entre ces margarines concernant ce paramètre, indicateur de texture, et cela pour les différentes températures.

## **5-4- Stabilité oxydative de la margarine**

### **5-4-1- Test de Rancimat**

La stabilité oxydante est un paramètre important en évaluant la qualité des corps gras, car elle donne une bonne évaluation de leur susceptibilité à la dégradation oxydante ; la cause principale de leur changement (Aparicio *et al.*, 1999).

Les courbes mentionnées dans la figure 16 représentent les résultats de la stabilité à l'oxydation des margarines au Tocoblend, à l'huile essentielle de *Citrus limon* extraite par expression à froid (HE<sub>1</sub>) et à l'huile essentielle extraite par hydrodistillation (HE<sub>2</sub>) respectivement.

A l'issue de ces résultats, nous pouvons dire que le processus d'oxydation se fait en deux périodes :

- La première : période d'induction ; se caractérise par une faible absorption de l'oxygène pendant laquelle les peroxydes se forment ;
- La deuxième : détérioration d'odeur et de saveur ; se caractérise par une absorption rapide de l'oxygène pendant laquelle les peroxydes non seulement se forment mais se décomposent ensuite sous l'effet d'une température élevée. Au cours de cette période, se forment des produits tels que les aldéhydes, les cétones et les acides gras à chaîne courte. Ces substances sont à l'origine d'une altération de l'odeur et de la saveur.

A partir des courbes de conductivité (Figure 16), le temps d'induction des margarines au Tocoblend, à l'HE<sub>1</sub> et à l'HE<sub>2</sub> est respectivement équivalent à 3.76 h, 6.42 h et 6.31 h. De là, nous pouvons dire que la margarine à l'HE<sub>1</sub> est la margarine qui a présenté la meilleure résistance à l'oxydation forcée par rapport aux deux autres, et que celle à l'HE<sub>2</sub> a mieux résisté que celle au Tocoblend. Aussi il faut noter qu'il y a une différence significative entre les temps d'induction des deux huiles et celui du Tocoblend. Par ailleurs, aucune différence significative entre les temps d'induction des deux huiles n'a été constatée.

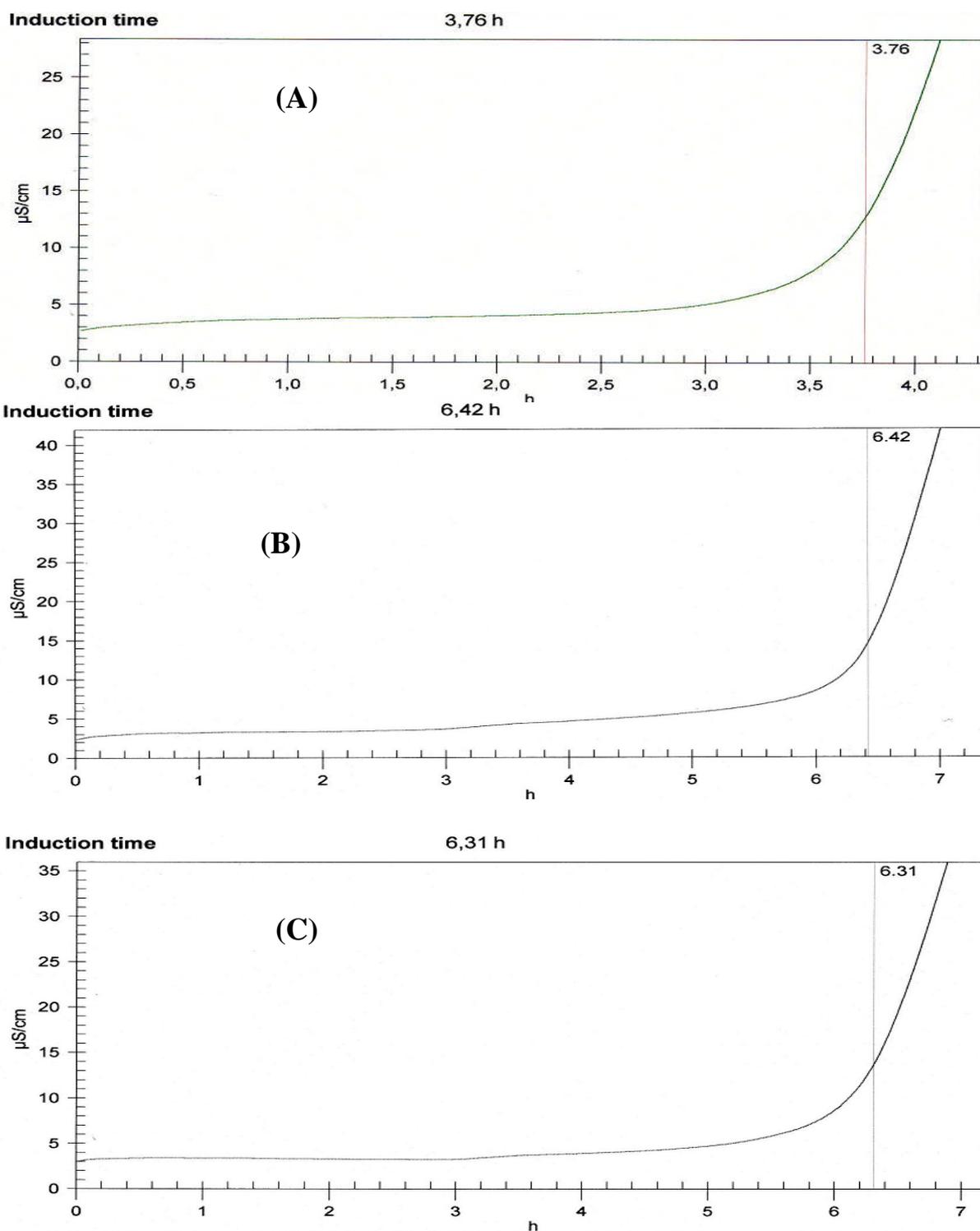


Figure 16. Courbes de conductivité de la margarine au Tocoblend (A), à l'HE<sub>1</sub> (B) et à l'HE<sub>2</sub> (C)

Le tableau 7 représente le facteur de protection ( $F_p$  = activité antioxydante relative) du Tocoblend et des huiles essentielles HE<sub>1</sub> et HE<sub>2</sub> sachant que la période d'induction de la margarine sans Tocoblend et sans huiles essentielles est de 2,05 h.

**Tableau 7.** Facteurs de protection (Fp) du Tocoblend et des huiles essentielles de *Citrus limon* ajoutés aux margarines élaborées

<b>Echantillon</b>	<b>PI (h)</b>	<b>Fp (AAR)</b>
<b>Tocoblend</b>	3,76 ± 0,055	1,83 ± 0,030
<b>HE<sub>1</sub></b>	6,42 ± 0,041	3,13 ± 0,020
<b>HE<sub>2</sub></b>	6,31 ± 0,02	3,07 ± 0,010

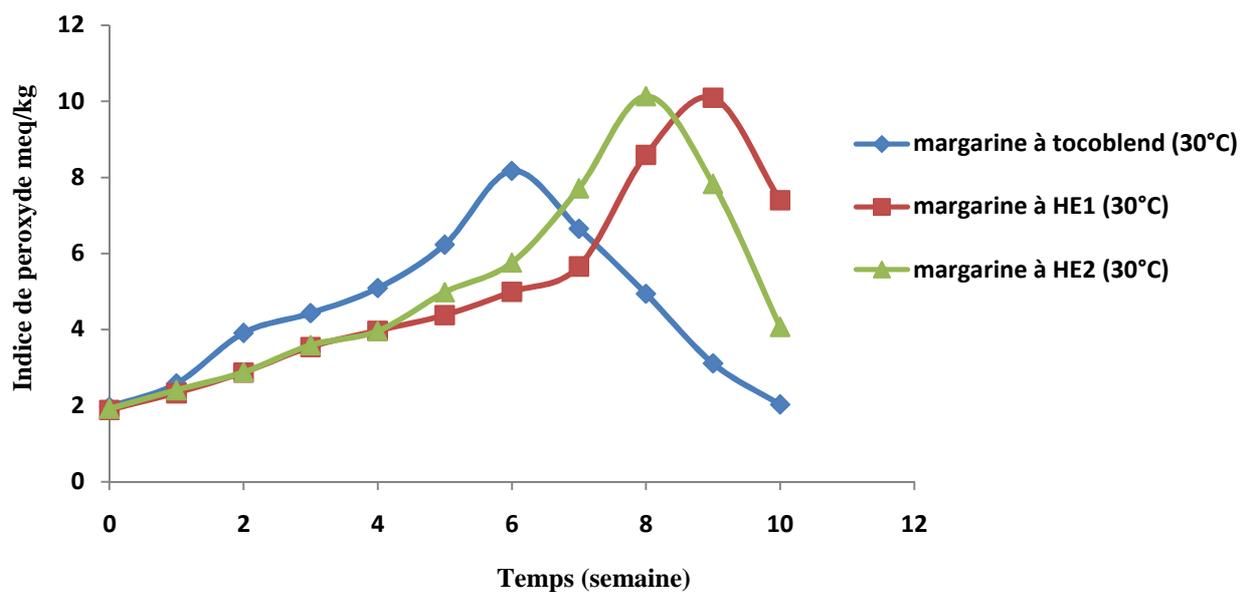
Par comparaison de l'efficacité de résistance à l'oxydation forcée et de l'activité antioxydante relative, nous pouvons mettre en ordre croissant l'effet antioxydant de nos huiles et du Tocoblend additionnés aux margarines comme suit : HE<sub>1</sub> > HE<sub>2</sub> > Tocoblend.

#### **5-4-2- Test de Schaal**

La variation de l'indice de peroxyde en fonction de la durée de stockage, est illustrée par la figure 17.

Les valeurs de l'indice de peroxyde au moment d'élaboration des margarines se présentent comme suit : 1.97 méq d'O<sub>2</sub> / kg pour la margarine au Tocoblend, 1.89 méq / kg pour la margarine à l'huile essentielle de *Citrus limon* extraite par expression à froid (HE<sub>1</sub>) et 1.92 méq d'O<sub>2</sub>/kg pour la margarine à l'huile essentielle de *Citrus limon* extraite par hydrodistillation (HE<sub>2</sub>). Ces résultats demeurent acceptables (< 5meq/kg) (Karabulut et Turan, 2006). La formation des peroxydes à partir des acides gras insaturés dépendrait de leur libération lors de l'hydrolyse, ce qui explique son augmentation.

A l'issu de ces résultats, nous avons remarqué que l'indice de peroxyde a atteint son seuil limite d'altération (5 meq/kg) à partir de la 6<sup>ème</sup> semaine pour la margarine à huile essentielle extraite de *Citrus limon* par expression à froid, à partir de la 5<sup>ème</sup> semaine pour la margarine à l'huile essentielle extraite par hydrodistillation et seulement à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine pour la margarine au Tocoblend. Aussi nous avons noté qu'il n'y a pas de différence significative entre l'indice de peroxyde des trois margarines après la première semaine et entre les deux margarines à l'huile essentielle (HE<sub>1</sub>, HE<sub>2</sub>) après la 4<sup>ème</sup> semaine. Au-delà de ces périodes une différence significative a été constatée.



**Figure 17.** Variation de l'indice de peroxyde en fonction du temps de stockage, des margarines au Tocoblend, à HE<sub>1</sub> et à HE<sub>2</sub>

Nous avons remarqué aussi la diminution de la teneur en peroxyde de la margarine au Tocoblend, à l'HE<sub>2</sub> et à l'HE<sub>1</sub> respectivement à partir de la 6<sup>ème</sup>, la 8<sup>ème</sup> et la 9<sup>ème</sup> semaine. Cela peut être expliqué par la décomposition des peroxydes sous l'effet de la température en aldéhydes, cétones et acides gras à chaîne courte.

En se référant à ces résultats, nous pouvons dire que les margarines à l'huile essentielle ont mieux résisté à la peroxydation que celle au Tocoblend, et que la margarine à l'HE<sub>1</sub> est mieux protégée contre l'oxydation que celle à l'HE<sub>2</sub>. Cela nous permet de classer l'ordre d'efficacité antioxydante comme suite : HE<sub>1</sub> > HE<sub>2</sub> > Tocoblend. Ces résultats concordent avec le classement constaté dans le test au DPPH°, dans le test de blanchissement de β-carotène et dans le test de Rancimat.

## 6- Métrologie sensorielle

### 6-1- Analyse sensorielle

Les résultats de l'analyse sensorielle (arôme, couleur, texture et saveur) des margarines élaborées sont représentés dans les figures 18, 19, 20, 21.

**Ech 1** : margarine au Tocoblend

**Ech 2** : margarine à HE<sub>1</sub>

**Ech 3** : margarine à HE<sub>2</sub>

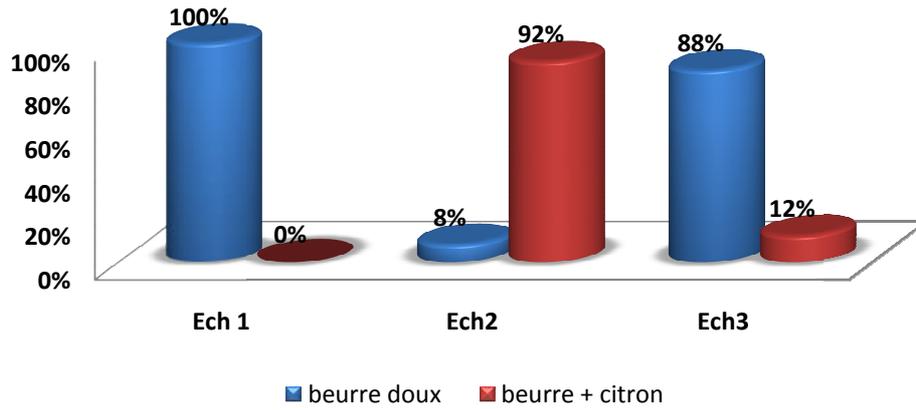


Figure 18 : Résultats de l'évaluation de l'arôme

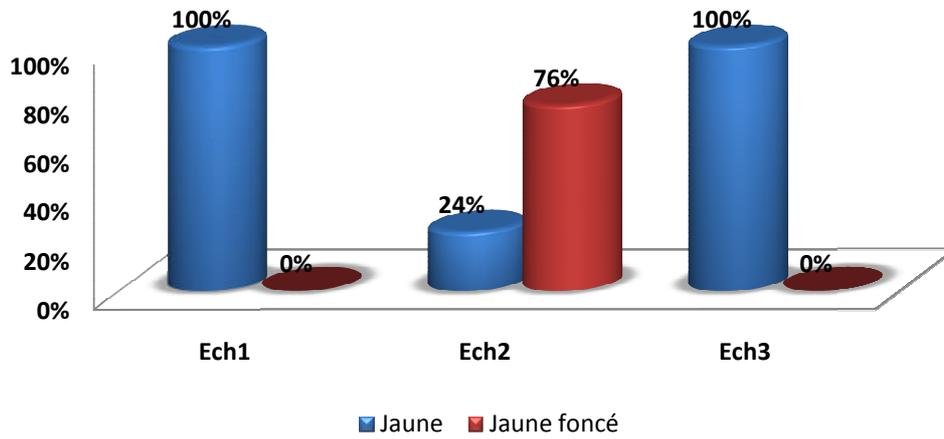


Figure 19. Résultats de l'évaluation de la couleur

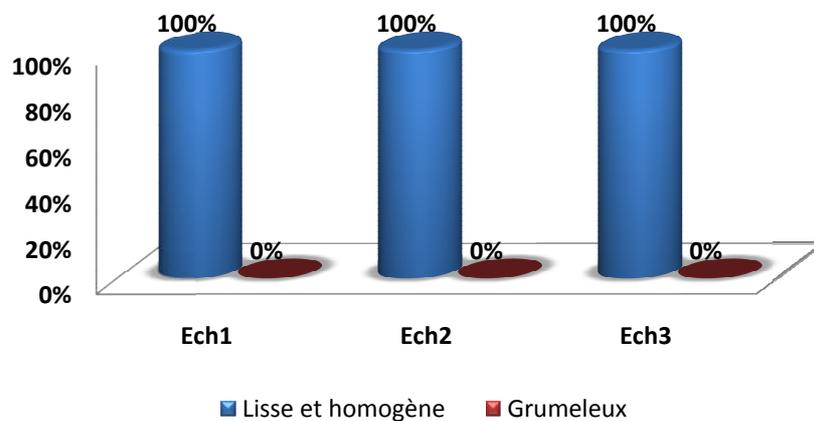


Figure 20. Résultats de l'évaluation de la texture

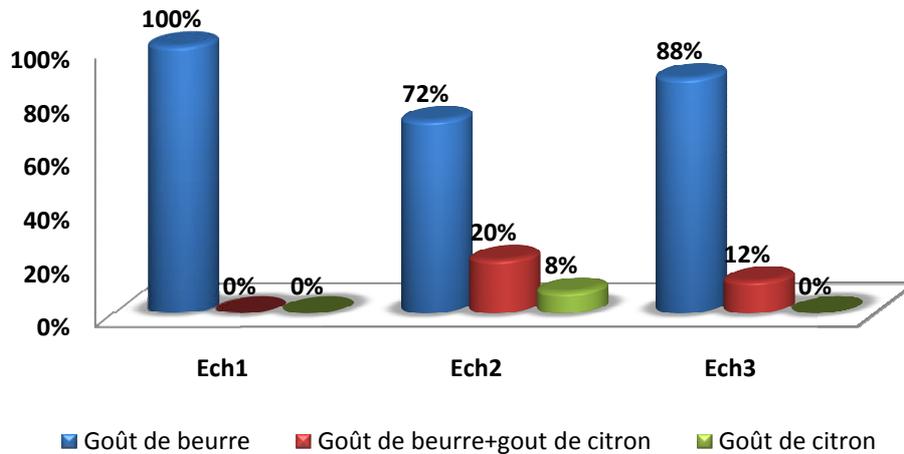


Figure 21. Résultats de l'évaluation de la saveur

En se référant aux résultats obtenus, nous pouvons dire que l'huile essentielle de *Citrus limon* extraite par expression à froid a modifié légèrement les caractéristiques (arôme et couleur) de la margarine dans laquelle elle est additionnée. Par ailleurs, l'huile essentielle de *Citrus limon* extraite par hydrodistillation n'a pas influencé sur les caractéristiques sensorielles étudiées.

## 6-2- Analyse hédonique

L'échelle hédonique se compose d'un seul élément : le plaisir ou le déplaisir évoqué par le sujet pour un aliment (Quannari *et al.*, 1997).

Les résultats de l'analyse hédonique sont représentés dans les figures 22 et 23.

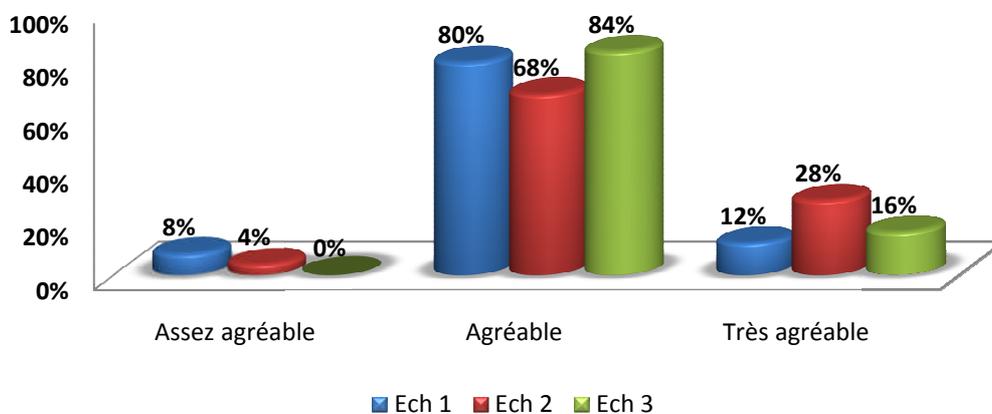
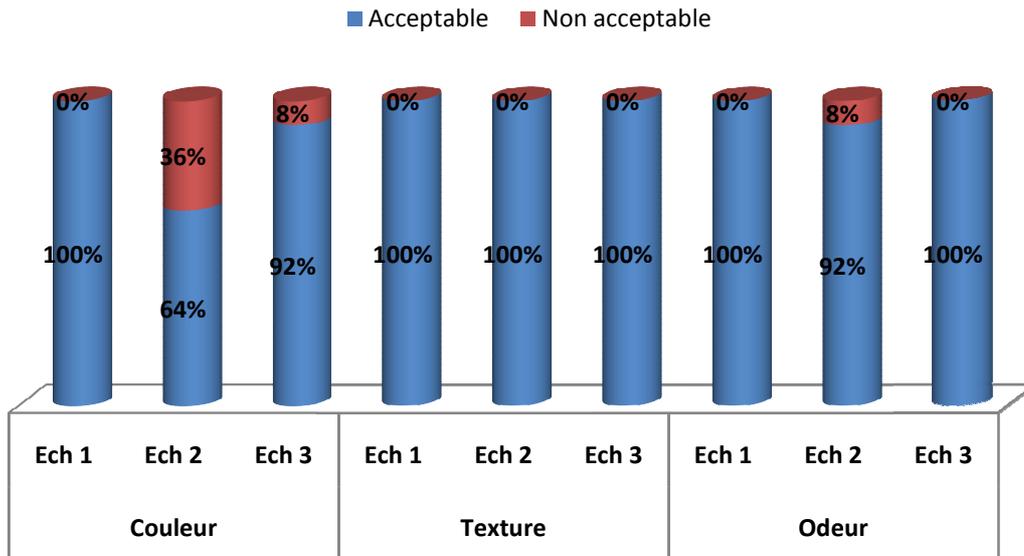


Figure 22. Résultats de l'analyse hédonique de la saveur des margarines étudiées



**Figure 23.** Résultats de l'analyse hédonique de la couleur, la texture et l'odeur des margarines étudiées

A l'issu de ces résultats et par comparaison au caractéristiques de la margarine au Tocoblend, nous pouvons constater que la margarine à l'huile essentielle de *Citrus limon* extraite par expression à froid et la margarine à l'huile essentielle extraite par hydrodistillation sont appréciées par les assesseurs que soit pour la saveur, la couleur, la texture et l'odeur.

# CONCLUSION

## CONCLUSION

Le présent travail a pour objectif l'exploitation des huiles essentielles de *Citrus limon* (variété *Euréka*) et leur valorisation à travers leur activité anti-oxydante et leur prix moins coûteux en les comparants à un antioxydant artificiel importé (le Tocoblend) utilisé au niveau de la margarinerie de Cévital.

A l'issu des résultats obtenus, l'évaluation du rendement en huiles essentielles de *Citrus limon* extraites par expression à froid (HE<sub>1</sub>) et par hydrodistillation (HE<sub>2</sub>) sont respectivement : 1.02% et 2.18%. L'activité anti-oxydante déterminée par le test de DPPH et le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène montre que les huiles essentielles extraites sont des excellents antioxydants naturels. Elles possèdent des capacités de neutralisation de DPPH puissantes et inhibent d'une manière efficace l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du  $\beta$ -carotène en les comparants au Tocoblend.

L'essai de formulation des margarines de table additionnées d'huiles essentielles de *Citrus limon* a été expérimenté, en vue de substituer le Tocoblend. Les indices de caractérisation des margarines élaborées (gras, non gras et point de fusion) s'avèrent conformes à la recette préétablie. En outre, l'indice de degré d'altération par oxydation (indice de peroxyde) est conforme aux normes. L'analyse des acides gras par CPG a révélé la présence des acides gras essentiels avec un rapport AGPI/AGS de 0.85, il est toutefois conforme aux recommandations des nutritionnistes.

Les résultats de l'évaluation de la stabilité oxydative par les tests de Rancimat et Schaal indiquent que les margarines à huiles essentielles de *Citrus limon* sont plus résistantes que celle au Tocoblend ; la margarine à l'HE<sub>1</sub> est la plus résistante vis-à-vis l'oxydation forcée.

Suite aux appréciations de la métrologie sensorielle, les margarines ainsi élaborées présentent une texture homogène et facile à tartiner. Elles sont beaucoup appréciées pour leur saveur, leur texture, leur odeur et leur couleur.

En perspective, il est souhaitable :

- d'étudier le pouvoir chélateur des métaux des huiles essentielles de *Citrus limon* afin de substituer d'autre additif ;

- d'étudier les autres activités biologiques de ces huiles (activités antimicrobienne, antifongique, etc.) ;
- d'exploiter les écorces d'autres agrumes comme les oranges pour élaborer autres types de margarine ;
- d'appliquer ces huiles essentielles à d'autres produits alimentaires en substitution à des antioxydants artificiels comme le BHT (butyle hydroxy toluène) et le BHA (butyle hydroxy anisole)

REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

- **ACTIA, 1999.** Evaluation sensorielle ; guide de bonnes pratiques, Document ACTIA. Cité par : **Daudin J.J. et Duby C., 2002.** Technique mathématiques pour l'industrie agroalimentaire. Ed : Lavoisier, 501p.
- **Adio A.M., 2005.** Isolation and structure elucidation of sesquiterpénoids from the essential oils of some liverworts (Hepaticae). Thèse pour le degré de Dr. rer. National à l'institut de la chimie organique, Université de Hambourg, 280 p.
- **AFNOR, 1982.** Recueil de normes françaises des produits dérivés des fruits et légumes jus de fruits. Ed. AFNOR, 325 p.
- **Alais C., Linden G. et Midlo L., 2003.** Biochimie alimentaire. Ed : Dunod, 245 (5) :51-71.
- **Andersan, A. J. C. et Williams, P. N., 1965.** Introduction and history, margarine (pp. 1–17). New York: Pergamon Press.
- **Anwar F., Hussain A.I., Iqbal S. et Bahanger M.I., 2006.** Enhancement of the oxidative stability of some vegetable oils by blending with *Moringa oleifera* oil. *Food Chemistry*, Article in Press. Cite par **Zidani S., 2009.** Valorisation des pelures de tomates séchées en vue de leur incorporation dans la margarine. Thèse de magister, option : Technologie Alimentaire. Laboratoire de Recherche Technologie Alimentaire LRTA, université M'hamed Bougara-Boumerdes, 74p.
- **AOCS, 1987.** Official and tentative methods of the American Oil Chemists' Society. Champaign. IL: AOCS Press.
- **AOCS, 1997.** Official and tentative methods of the American Oil Chemists' Society.
- **Aparicio R., Roda L., Albi M. A. et Gutiérrez F., 1999.** Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by rancimat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (47) : 4150–4155.
- **Ayesh R., Weststrate J.A., Drewitt1 P.N. et Hepburn P.A., 1999.** Safety evaluation of phytosterol esters. Part 5. faecal short-chain fatty acid and microflora content, faecal bacterial enzyme activity and serum female sex hormones in healthy normolipidaemic volunteers consuming a controlled diet either with or without a phytosterol ester-enriched margarine. *Food and Chemical Toxicology*. (37): 1127-1138.

- **Bachelot C., Blaise A., Corbel T. et Le Guernic A., 2006.** Les huiles essentielles : extraction et comparaison. U.C.O Bretagne : 1-18
- **Baljit S.G., Sandra D. et Suresh S.N., 2002.** Lipid shortenings. Food Research International (35) : 1015–1048.
- **Barry N., 2001.** Art d’extraire les huiles essentielles : De parfum à faire soi même. Ed : Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 125- 128.
- **Belaïche P., 1979.** Traité de phytothérapie et l’aromathérapie. Tome I : L’aromatogramme. Ed : maloine S.A., Paris, 204 p.
- **Benakmoum A., Abbeddou S., Ammouche A., Kefalas P. et Gerasopoulos D., 2008.** Valorisation of low quality edible oil with tomato peel waste. Food Chemistry (110) : 684 – 690.
- **Berger M.M., 2006.** Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme.* (20) : 48-53.
- **Blancke R., 2001.** Guide des fruits et légumes tropicaux. Ed : Eugen Ulmer, Paris. 288 p.
- **Blois E., 1958.** Déterminations antioxydantes par utilisation d’un radical libre stable, Nature, (181) : 1199-2000.
- **Bondet V., Brand-William W. and Berset C., 1997.** Lebensm-wiss.u.-Technol., 30, 609. Cité par : **Wanasundara P.K.J.P.D. et Shahidi F., 2005.** Antioxidants: science, technology, and applications. Edited by Fereidoon Shahidi. Copyright, John Wiley & Sons, Inc. 11 : 431-489.
- **Boyd B., Ford C., Koepke Michael C., Gary K., Horn E., McAnalley S. et McAnalley B., 2003.** Etude pilote ouverte de l’effet antioxydant d’Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. Glycoscience & Nutrition. 4(6) : 7-14.
- **Brasseur L., Yherond P. et Legrand A., 1995.** Pouvoir antioxydant total du plasma. Act. Pharm. Bid. Clin. (8) : 239-244.
- **Bruneton J., 1987.** Mono et sesquiterpènes In éléments de phytochimie et de pharmacognosie. Ed : Tec & Doc., Lavoisier, Paris, 223-234.

- **Bruneton J., 1993.** Pharmacognosie et phytochimie, plantes médicinales. Ed : Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 915p.
- **Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie- Phytochimie- Plantes médicinales. Ed : Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 1120 p.
- **Cao G.H., Alessio H.M. et Cutler R.G., 1993.** Oxygen – radical absorbency capacity assay for antioxydants, Free Radic. Biol. Med., 14 : 303-311.
- **Carée P., 1953.** Précis de technologie et de chimie industrielle. Tome III. Ed : Ballière J.B. et fils. Cité par **Mohammedi Z., 2006.** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse pour l'obtention du diplôme de magister en Biologie. Option : Produits naturels, activités biologiques et synthèse. Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen. 155 p.
- **Charles Y.J. et Darrigol J.L., 1987.** Guide pratique de diététique familiale. Ed : Dangles, 320 p.
- **Chateris W. et Keogh K., 1991.** Fats and oil in table spread. Lipid Technology, (3) : 16-22.
- **Chrysam M.M., 1985.** Table spreads and shortenings. In T. H. Applewhite (Ed.), Bailey's industrial oil and fat products, New York: John Wiley and Sons (3) : 41–125.
- **Chrysam, M. M., 1996.** Margarines and spreads. In Hui, Y. H. Bailey's industrial oil and fat products, (4th ed.) John Wiley and Sons Inc.
- **Couderc V.L., 2001.** Toxicité des huiles essentielles. Thèse de grade Docteur Vétérinaire. Université Paul Sabatier de Toulouse, 61 p.
- **Crespo M.E., Jiménez J. et Navarro C., 1991.** Special methods for the essential oils of the genus *Thymus*. Modern methods for plant analysis, p. 41- 61.
- **Daillant-Spinnler B., MacFie H.J.H., Beyts P.K. et Hedderley D., 1997.** Relationships between perceived sensory properties and major preference directions of 12 varieties of apple from the southern hemisphere. Food Quality and Preference, (2) : 113-126.
- **Débuigine G. et Couplan F., 2008.** Petit Larousse des plantes qui guérissent. Ed : Larousse, Paris. 895 p.

- **De Greyt W. O. et Huyghebaert A., 1993.** Food and nonfood applications of milk fat. *Lipid Technol.*, (5) : 138-140.
- **DeMan L. et DeMan J.M., 1994.** Functionality of palm oil and palm kernel oil in margarine and shortening, *PORIM Occasional Papers*; (32) : 1-14.
- **Dimitrios T., Vasilios Z. et Haralambos K., 2003.** Fatty acid content of margarines in the Greek market (including trans-fatty acids) : a contribution to improving consumers information. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* (54) : 135–141.
- **Dubois C., 2006.** Les arbres fruitiers. Ed : Rustica, Paris. 127 p.
- **Dupin H., Cuq J.L., Maleviak M.I., Leynaud-Rouaud C. et Berthier A.M., 1992.** Alimentation et nutrition humaine. Ed: ESF, Paris, 1515p.
- **Duthie G.G., Ganzalez B.M., Morrice P.C. et Arthur J.R., 1991.** *Free Rad. Res. Comms*, 15 : 35-40. Cite par **Maamri S., 2008.** Etude de *Pistacia atlantica* de deux regions de sud algérien : dosage des lipids, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens. Thèse de Magister en Biologie, option : Biochimie et Microbiologie Appliquées. Université M'Hamed Bougara Bumerdes, 108 p.
- **Faur L., 1996.** Margarine technology. *Oils and Fats Manual* Karleskind, A. Vol. 2, Lovoisier Publishing, Paris : 938-987.
- **Fazzalari F.A., 1978.** *Odor and taste threshold values data*. Philadelphia: American society for testing and materials.
- **FDA (Food and Drug Administration), 1993.** Code of federal regulations, 21CFR101.67, 58 FR 2455. Cité par **Koca N., Kocaoglu-Vurma N.A., Harper W.J. et Rodriguez-Saona L.E., 2010.** Application of temperature-controlled attenuated total reflectance-mid-infrared (ATR-MIR) spectroscopy for rapid estimation of butter adulteration *Food Chemistry* (121) : 778–782.
- **Ferreria A., Proenca C., Serralheiro M.L.M. et Araujo M.E.M., 2006.** The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plant from Portugal. *Journal of ethnopharmacology*. (108) : 31-37.
- **Frankel E.N., 1980.** Lipid oxidation. *Prog Lipid Res.* (19) : 1-22.

- **Frankel E.N., 2005.** *Lipid oxidation*. Bridgwater : The Oily Press LTD.
- **Garnéro J., 1976.** Quelques problèmes rencontrés au cours de l'obtention, du contrôle et de l'étude de la composition d'une huile essentielle – *Rivista Italiana EPPOS*, pp. 105-125.
- **Garnéro J., 1991.** Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalization. Ed : Techniques- Encyclopédie des médecines naturelles, Paris p. 2- 20.
- **Genot C., Meynier A. et Riaublanc A., 2003.** Lipid oxidation in emulsions. In : Kamal-Eldin, ed. *Lipid oxidation pathways*. Champaign : AOCS Press, 190-234.
- **Genot C. Eymard S. et Viau M., 2004.** Comment protéger les acides gras poly-insaturés à longues chaînes oméga 3 vis à vis de l'oxydation? *OCL* (11) : 133-141.
- **Gordon M.H., 1990.** The mechanism of antioxidant in vitro. "Food antioxidants": Ed. HUDSON B.J.F. pp: 1-18.
- **Grosch W., 1982.** Lipid degradation products and flavour. In : Morton ID, Macleod AD, eds. *Food flavours*. Amsterdam : Elsevier : 325-98.
- **Hadi M., 2004.** La quercétine et ses dérivés : molécule à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences de l'Université Louis Pasteur Domaine : Pharmacochimie. 155p.
- **Ho S.S. et Pal S., 2005.** Margarine phytosterols decrease the secretion of atherogenic lipoproteins from HepG2 liver and Caco2 intestinal cells. *Atherosclerosis*, (182) : 29–36.
- **Iserin P., Masson M., Restellini J.P., Ybert E. et Moulard F., 1996.** Encyclopédie des plantes médicinales ; Identifications, Préparations, Soins. Ed : Larousse-Bordas pour l'édition originale en langue française, France. 335 p.
- **ISO. 6886, 2006.** Corps gras d'origines animale et végétale – Détermination de la stabilité à l'oxydation (essai d'oxydation accélérée). Deuxième édition : 1-14.
- **Judde A., 2004.** Prévention de l'oxydation des acides gras dans un système cosmétique : mécanismes, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications ? *OCL* 11 (6) : 414-418.

- **Karabulut I. et Turan S., 2006.** Some properties of margarines and shortenings marketed in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis* (19) : 55–58
- **Karleskind A., 1992.** Manuel des Corps Gras. Ed.Tech & Doc,Paris, Tome 1 et Tome II.1579 p.
- **Kartal N., Sokmen M., Tepe B., Daferera D., Polissiou M. et Sokmen A., 2007.** Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*. (100) : 584–589.
- **Kim D.k. et Lee C.Y., 2004.** Comprehensive Study on Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Various Polyphenolics in Scavenging a Free Radical and its Structural Relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. (44) : 253–273.
- **Kohen R. et Nyska A., 2002.** Oxidation of biological systems : oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. (30) : 620-650.
- **Labuza TP., 1971.** Kinetics of lipid oxidation in foods. *CRC Critical Reviews Food Technology*, (2) : 355-405.
- **Laia O.M., Ghazalia H.M., France C. et Chong C.L., 2000.** Physical and textural properties of an experimental table margarine prepared from lipase-catalysed transesterified palm stearin: palm kernel olein mixture during storage. *Food Chemistry* (71) : 173-179.
- **Laurent A. et Delerme C., 2008.** Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles. Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. AFSSAPS : 1-17
- **Lehucher-Michel M.P., Lesgards J.F., Delubac O., Stocker P., Durand P. et Prost M., 2001.** Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*. (30) : 1076-1081.
- **Li C., Oldham C.D., et May S.W.N., 1994.** N-Dimethyl-1,4- phenylenediamine as alternative reductantfor peptidylglycine-amidating mono-oxygenase catalysis. *Biochem. J.* (300) : 31-36.

- **Li Peiwu., Hopia A., Jaris S., TeijoY. et Heikki V., 1999.** TLC method for evaluation of free radical scavenging activity of rapeseed meal by video scanning technology. *Chemistryand Nutrition*, (10) : 123-187.
- **Lisu W., Jui-Hung Y., Hsiao-Ling L. et Wul M.J., 2003.** Antioxidant effect of methanol extracts from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbo nucifera* Gertn). *Journal of food and Drug Analysis*. 11(1) : 60-66.
- **Luterotti S., Bicanic D. et Pojzgaj R., 2006.** New simple spectrophotometric assay of total carotenes in margarines. *Analytica Chimica Acta*, pp. 466–473.
- **Magin D.V., Lewin G., Popov I.N., Izmailov Yu D. et Vladimirov Yu A., 2000.** Photochemi-luminescence as a tool to determine the antioxidant activity in biological systems, Mathematic modeling. Lavoisier, 419p.
- **Manley D.J.R., 1983.** Technology of biscuits, crackers and cookies. Chichester, England : Ellis Horwood Limited Publishers : 61-79.
- Mansouri A., Embarek G., Kokkalou E. et Kefalas P., 2005.** Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry*. (89) : 411-420.
- **Marc F., Davin A., Deglène-Benbrahim L., Ferrand C., Baccaunaud M. et Fritsch P., 2004.** Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. M/S : médecine sciences, (20) : 458-463.
- **Martin A., 2001.** Apports nutritionnels conseillés pour la population française. Paris : Tec & Doc, Lavoisier.
- **Meilgaard M., Civille G.V. et Carr B.T., 1987.** Sensory Evaluation Techniques. CRC Press.
- **McClements D. J. et Decker E. A. 2000.** Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*, 65(8) : 1270–1281.
- Miettinen T.A., Puska P., Gylling H., Vanhanen H. et Vartiainen E. 1995.** Reduction of serum cholesterol with sistostanol-ester margarine in a mildly hypercholesterolemic population. *The New England journal of Medicine*, (333) : 1308-1312.

- **Miller H.E., 1971.** J. Am. Oil Chem. Soc. 48, 91. Cité par **Avlessi F., Dangou J., Wotto V., Alitonou G.A. Sohounhloue D. et Menut C., 2004.** Propriétés antioxydantes de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* (Wild) Hook. Chimie (7) : 1057–1061.
- **Miskandar S., Yaakob M, Mohd Suria A.Y. and Russly A.R., 2005.** Quality of margarine : fats selection and processing parameters. Ed : *Asia Pac J Clin Nutr*;14 (4):387-395.
- **Molyneux P., 2004.** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH<sup>o</sup>) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin ; Journal of Sciences and Technologies, 26 (2): 211-219.
- **Morelle J., 1988.** Peroxydes lipidiques, radicaux libres, vieillissement et lipoaminés acides : Parfums, Cosmétiques, Arômes, (79) : 71-78.
- **Murcia M. A., Martinez-Tome M., Jiménez A. M., Vera A., Honrubia M. et Parras P., 2002.** Antioxidant activity of edible fungi (truffles and mushrooms): losses during industrial processing. Journal of Food Protection, (65) : 1614–1622.
- **Mussner M.J., Parhofer K.G., Bergmann K.V., Schwandt P., Broedl U. et Otto C., 2002.** Effects of phytosterol ester-enriched margarine on plasma lipoproteins in mild to moderate hypercholesterolemia are related to basal cholesterol and fat intake. *Metabolism*, 51 (2) : 189-194.
- **Nawar W.W., 1985.** Lipids. Food Chemistry: 2<sup>nd</sup> revised and expanded ed. New York : Marcel Dekker Inc. : 139- 245.
- **Neve J., 1995.** Human selenium supplementation as assessed by changes in blood selenium concentration and glutathione peroxidase activity. Trace Elements Med Biol, (9) : 65-73.
- **Noor Lida H.M.D., Sundram K., Siew W.L., Aminah A. et Mamot S., 2002.** TAG composition and solid fat content of palm oil, sunflower oil, and palm kernel olein blends before and after chemical interesterification. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* (79): 1137-1144.
- **Ovesen L., Torben L. et Hansen K., 1998.** Fatty acid composition and contents of trans monounsaturated fatty acids in frying fats, and in margarines and shortenings marketed in Denmark. Journal of the American Oil Chemists' Society (75) : 1079–1083.

- **Padrini P. et Lucheroni M.T., 1996.** Le grand livre des huiles essentielles –guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences. Ed : De Vecchi, Paris. Pages 11, 15, 61 et 111.
- **Perry N.B., Anderson R.E. et Brenna N.J., 1999.** Essential oils from Dalmatian sage (*Salvia officinalis*) : variation among individuals, plant parts, seasons and sites. J. Agric. Chem. 47(5) : 48-54.
- **Peyron L. et Richard H., 1992.** Extraction des épices et herbes aromatiques et différents types d'extraits. Epices et aromates. Tec et Doc – Lavoisier, APRIA., Paris. 108p.
- **Pingot A., 1998.** Les huiles essentielles. Ed : Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 230- 236.
- **Porter N., 2001.** Essential oils and their production. Crop & Food Research. Number 39.
- **Prakash D., Upadhyay G., Brahma N. et Singh H.B., 2007.** Singh antioxidant and free radicalscavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*). *Food Chemistry*. (104) : 783-790.
- **Prior E., 2003.** Usage des corps gras alimentaires dans les différents secteurs de la technologie alimentaire. In : Graille J, ed. *Lipides et corps gras alimentaires* : 87-147.
- **Quannari E.M., Courcoux P., Lejeune M. et Maystre O., 1997.** Comparaison de trois stratégies de détermination d'un compromis en évaluation sensorielle. *Revue de Statistique Appliquée*, XLV (1) : 61-74.
- **Rahmani M., 2007.** Méthodes d'évaluation de la stabilité oxydative des lipides. Les Technologies de Laboratoire (2) : 18-21.
- **Rai M.K., Acharya D. et Wadegaonkar P., 2003.** Plant derived-antimycotics : potential of Acteraceous plants. In : Plantb-derived antimycotics : Current trends and future prospects, Haworth Press, N-York, Londin, Oxford. 165-185.
- **Roberfroid M., 2002.** Aliments Fonctionnels. Ed : Lavoisier, Paris, 475p.
- **Robert A. et Lobstein A., 2005.** Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Ed : Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 522 p.
- Roger F., 1974.** Les industries des cors gras. Ed : Lavoisier. Paris, 283-291.

- **Sanchez-Moreno C., 2002.** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Food Science and Technology*. (8) : 121-137.
- **Santiago L. A., Hiramatsu M. et Mori A., 1992.** *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 38, 297.
- **Serfaty-Lacrosniere C., Nigon F., Chauvois D., Neveu C., Chapman J. et Bruckert E., 2001.** Les phytostérols : Une nouvelle approche dans la prise en charge diététique de l'hypercholestérolémie. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, (36) : 341-347.
- **Sharma S.K. et Maguer M.L., 1996.** Kinetics of lycopène degradation in tomato pulp solid under different processing and storage condition. *Food Research International*, (29) : 309 - 315.
- **Simpson W.T., 1999.** Drying and control of moisture content and Dimensional changes. Madisan, Forest Products Laboratory. 463p.
- **Siripriya G., Chandrasekharan K., Murty V.S. et Chandra T.S., 1996.** *Food Chem.*, 57, 539.
- **Smallfield B., 2001.** Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop & Food Research*. Number 45, 4p.
- **Soares J.R., Dinis T.C.P., Cunha A.P. et Almeida L.M., 1997.** Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Radical Research*, (26) : 469–478.
- **Sousa E., Chiavone-Filho O., Moreno M.T., Silva D.N., Marques M. et Meireles M., 2002.** Experimental results for the extraction of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. Using Pressurized carbon dioxide. Ed : *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 19 (2) : 229-241.
- **SSHA, 1998.** *L'évaluation sensorielle : manuel méthodologique*. Tec. & Doc. Lavoisier, Paris.
- **Svoboda K.P. et Hampson J.B., 1999.** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidants, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant biology department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, U.K., KA6 5HW.

- **Twidwell E.K., Wagner J.J., et Thies Nancy J., 2002.** Use a Microwave Oven to Determine Moisture Content of Forages. 8077p.
- **Uchiyama M., Suzuki Y. et Fukuzawa F., 1968.** Etude biochimique de la fonction physiologique du tocopheronolactone. *Yakugazu Zasshi* (88) : 678-683.
- **Villière A. et Genot C., 2004.** *Interactions protéines-métaux et stabilité à l'oxydation d'émulsions stabilisées par des protéines. 16èmes rencontres Agoral.* Nantes. Paris : Tec et Doc, Lavoisier, 32-39.
- **Villière A. et Genot C., 2006.** Approche physico-chimique et sensorielle de l'oxydation des lipides en émulsions. INRA-France, 152-159.
- **Vogt A., Thomas H., Schulze S., Steinhagen-Thiessen E. et Kassner U., 2004.** Effect of phytosterol ester-enriched margarine and diet compared to diet on plasma lipids in hypercholesterolemic subjects. *74th EAS Congress, Seville, Spain.* pp. 156.
- **Wanasundara U., Amarowicz, R., Shahidi F. et Agric J., 1994.** *Food Chem.* (42) : 1285.  
Cité par **Mighri H., Hajlaoui H., Akrouf A., Najjaa H. et Neffati M., 2010.** Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone. *Chimie* (13) : 380–386
- **Werner M., 2002.** Les huiles essentielles : réveil du corps et de l'esprit. Éditions Vigot, collection Santé Bien-être, 95 p.
- **Wettasinghe M. et Shahidi F., 2000.** *Food Chem.*, 70, 17.
- **Wolff, J.P., 1968.** Manuel d'analyse des corps gras. Ed : Azoulay, Paris. 524p.
- **Yildirims A., Mavi A., Kara A.A. et Agric J., 2001.** *Food. Chem.* 49 : 4083.
- **Yoshida T., Mori K., Hatano T., Okumura T., Uchura I., Komagoe K., Fujita Y. et Okuda T., 1989.** *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 1919.

# ANNEXES

Annexe 1



*Citrus limon* (variété *Euréka*)



Installation de l'hydrodistillateur

Annexe 2

## Fiche technique de Tocoblend



## Data Sheet

## Tocoblend™ L70 IP

<b>Description:</b>	Tocoblend™ L70 IP is a natural food grade antioxidant containing d-mixed tocopherols (70%) in sunflower oil. Base material has been separated and controlled by IP handling in order to avoid the contamination of GMO products.		
<b>Composition:</b>		Cas n°:	Einecs n°:
	Natural tocopherols:	70% ±0.2%	-
	Sunflower oil:	30% ±0.2%	8001-21-6 232-273-9
<b>Specifications:</b>	Slightly viscous, clear to slightly hazy brownish-red oil.		
• <b>Appearance:</b>	Slightly viscous, clear to slightly hazy brownish-red oil.		
• <b>Assay on 100% tocopherol basis:</b>	α-tocopherols:	11 -21 %	
	β-tocopherols:	1 - 5 %	
	γ-tocopherols:	50 - 65 %	
	δ-tocopherols:	20 - 30 %	
• <b>Refractive index <math>n_D^{20}</math>:</b>	1.493 - 1.499		
• <b>Specific gravity (25°C):</b>	0.920 - 0.960 g/ml.		
<b>Solubility:</b>	Tocoblend™ L70 IP is soluble in fats and oils and insoluble in water.		
<b>Usage:</b>	Décantation des huiles essentielles while stirring, until the		
<b>In-use concentration:</b>	200 - 500 ppm.		
<b>Shelf life:</b>	Tocoblend™ L70 IP is stable for 24 months from the date of production when kept under the below mentioned storage conditions in unopened original packing.		
<b>Storage:</b>	Store in a cool and dry place (15°C - 25°C) in unopened original packing.		
<b>Packing:</b>	5, 10, 20 kg PE jerry can, 200 L metal drum or 1000 L IBC.		
<b>Product code:</b>	6572x (Last digit indicates packaging size).		
<b>Legal status:</b>	EEC regulation 95/2/EEC.		
<b>Tariff number:</b>	29369019		
<b>Benzo-a-pyrene:</b>	< 1 ppb.		
<b>Allergens:</b>	No labelling required according to Directive 2003/89/EC Annex IIIa.		
<b>BSE status:</b>	Negative.		
<b>GMO status:</b>	Identity preserved, no labelling required according to EC directives 1829/2003 and 1830/2003.		
<b>Labelling:</b>	E-306 (natural tocopherols)		
<b>Kosher/Halal:</b>	Kosher: Organized Kashrus Laboratories (Circle K). Halal upon request.		

Vitablend Nederland bv  
P.O. box 220  
8470 AE Wolvega,  
The Netherlands  
Tel: +31.561.691.888  
Fax: +31.561.614.501  
www.vitablend.nl

PLEASE NOTE: this specification is provided for information purposes only and should not be relied upon a basis for product performance. It is suggested you evaluate the product on at least a laboratory basis prior to its commercial usage. This specification may be superseded by a later issue. Please consult your sales representative to confirm you have the correct specification. NO WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A SPECIFIC USE OR PURPOSE, EXPRESS OR IMPLIED, ARE MADE. These specifications are not intended to and shall not be construed to be instructions or suggestions for use which may be in violation of valid patent rights.

Date: October 19<sup>th</sup>, 2006  
Version: 3.0



**Annexe 3**



Chaine pilote de la margarinerie

**Annexe 4**



Appareil de Rancimat

## Annexe 6

**Bulletin de l'analyse hédonique**

Nom : ..... Prénom : .....

<b>Saveur</b>	<b>Note</b>	<b>Ech1</b>	<b>Ech2</b>	<b>Ech3</b>
Extrêmement désagréable	1			
Très désagréable	2			
Désagréable	3			
Assez désagréable	4			
Ni désagréable ni agréable	5			
Assez agréable	6			
Agréable	7			
Très agréable	8			
Extrêmement agréable	9			
<b>Couleur</b>	Acceptable			
	Non acceptable			
<b>Texture</b>	1			
	2			
	3			
	4			
	5			
	6			
	7			
	8			
	9			
<b>Odeur</b>	Acceptable			
	Non acceptable			

**Annexe 5**

**Bulletin de l'analyse sensorielle**

Nom : ..... Prénom : .....

1. Quelle est l'arôme des margarines présentées ?

<b>Arôme</b>	<b>Ech1</b>	<b>Ech2</b>	<b>Ech3</b>
Beurre doux			
Beurre + citron			

2. Quelle est la couleur des margarines présentées ?

<b>Couleur</b>	<b>Ech1</b>	<b>Ech2</b>	<b>Ech3</b>
Jaune			
Jaune foncée			

3. Décrire la texture des margarines présentées.

<b>Texture</b>	<b>Ech1</b>	<b>Ech2</b>	<b>Ech3</b>
Lisse			
Homogène			
Grumeleux			

4. Décrire la saveur des margarines présentées.

<b>Saveur</b>	<b>Ech1</b>	<b>Ech2</b>	<b>Ech3</b>
Goût du beurre			
Goût du beurre+ Goût du citron			
Goût du citron			

## ملخص :

تركز هذا العمل على إبراز قيمة الزيوت الأساسية لـ *Citrus limon* هذه الأخيرة تم استخلاصها عن طريق الضغط وعن طريق التقطير بالماء. المرود المتحصل عليه هو على التوالي 1,02% و 2,18%. درس النشاط المضاد للأكسدة للزيوت المستخلصة باختبار DPPH<sup>o</sup> ، أرجع هذا الجذر القوي بطريقة فعالة بالزيوت HE<sub>1</sub> و HE<sub>2</sub> بالمقارنة بـ Tocoblend.

أكدت هذه النتائج باختبار ابيضاض β- carotène. سمح كلا الاختبارين بترتيب الزيوت الأساسية المستخلصة من بين المواد المضادة جد فعالة مقارنة بـ Tocoblend.

إن محاولة تركيب مرغرين الماندة المضاف إليها الزيوت الأساسية جريت من أجل استغلالها وتبديل مادة إضافية إصطناعية Tocoblend .

الخصائص الفيزيوكيميائية للمرغرين المصنعة ( الدسمة ، غير الدسمة ، درجة الانصهار ) تبدو مطابقة للوصفة المنتظرة ، بالإضافة مؤشر البيروكسيد مطابق للمعايير. تم تحليل مكونات المرغرين بواسطة CPG ، هذا التحليل بين غناها بأحماض دسمة أساسية بالنسبة أحماض دسمة غير مشبعة / مشبعة تساوي 0,85 . تقييم استقرار للأكسدة تمت باختبار Schaal و Rancimat. تشير النتائج المتحصل عليها إلى أن مرغرين المضاف إليها الزيوت الأساسية لـ *Citrus limon* هي أكثر مقاومة بالمقارنة لمرغرين بـ Tocoblend والمرغرين بالزيوت الأساسية HE<sub>1</sub> تبدو أكثر مقاومة بالنسبة للأكسدة الحتمية .

إن علم المقياس والأوزان الخاصة بالحواس قد أجريت عن طريق مستشارين بمصنع Cévalit وتشير إلى أن مرغرين بالزيوت الأساسية المتحصل عليها تعتبر متجانسة ، ذات لون،نكهة ورائحة مقبولة ومستحسنة .

---

الكلمات الدالة: الزيوت الأساسية ، *Citrus limon* ، الضغط ، التقطير بالماء ، النشاط المضاد للأكسدة ، Tocoblend, مرغرين، الأكسدة الحتمية .

## RESUME

Ce travail s'est concentré sur la valorisation des huiles essentielles de *Citrus limon*. Ces dernières ont été extraites par expression à froid et par hydrodistillation, les rendements obtenus sont équivalents respectivement à 1.02% et 2.18%. L'activité antioxydante des huiles extraites a été étudiée par le test de DPPH°, ce radical puissant a été efficacement réduit par l'HE<sub>1</sub>, par l'HE<sub>2</sub> par comparaison au Tocoblend. Ces résultats ont été confirmés par le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène. Les deux tests nous ont permis de classer les huiles essentielles de *Citrus limon* extraites parmi les antioxydants plus puissants par rapport au Tocoblend.

L'essai de formulation des margarines de table additionnées d'huiles essentielles de *Citrus limon* a été expérimenté, en vue de les exploiter et de substituer un additif synthétique ; le Tocoblend. Les caractéristiques physico-chimiques des margarines élaborées (gras, non gras et point de fusion) s'avèrent conformes à la recette préétablie. En outre, l'indice de peroxyde est conforme aux normes. L'analyse des acides gras a été faite par CPG, elle a montré la richesse de nos margarines en acides gras essentiels avec un rapport AGPI/AGS de 0.85. L'évaluation de la stabilité oxydative est réalisée par les tests de Rancimat et Schaal, les résultats obtenus ont montré que les margarines à huiles essentielles de *Citrus limon* étaient plus résistantes que celle au Tocoblend et que la margarine à l'HE<sub>1</sub> était la plus résistante vis-à-vis l'oxydation forcée.

La métrologie sensorielle a été faite par les assesseurs de la margarinerie de Cévital et indique que les margarines aux huiles essentielles obtenues sont considérées comme étant homogènes, de couleur, de saveur et d'odeur acceptables et appréciées.

---

**Mots clés :** huile essentielle, *Citrus limon*, expression à froid, hydrodistillation, activité antioxydante, Tocoblend, margarine, oxydation forcée.

## ABSTRACT

This work concentrated on the valorization of essential oils of *Citrus limon*. These last were extracted by cold expression and by hydrodistillation, the results gave outputs of 1.02% and 2.18% respectively. The antioxidant activity of extracted oils was studied by the test of DPPH, this powerful radical was effectively reduced by the HE1, the HE2 that by Tocoblend. These results were confirmed by the test of whitening of  $\beta$ -carotene. The two tests have enabled us to classify essential oils of *Citrus silt* extracted among antioxidants powerful compared to Tocoblend.

The test of formulation of the margarines of table added with essential oils of *Citrus silt* was tested, in order to exploit them and to substitute a synthetic additive; Tocoblend. The characteristics physicochemical of the elaborate margarines (fat, nonfatty and point melting) prove to be in conformity with the preestablished receipt. Moreover, the peroxide index is in conformity with the standards. The analysis of the fatty acids was made by CPG, it showed the richness of our margarines in essential fatty acids with a report/ratio AGPI/AGS of 0.85, it is however in accordance to the recommendations of the nutritionnists. The evaluation of oxidative stability is carried out by the tests of Rancimat and Schaal, the results obtained reported that the margarines with essential oils of *Citrus silt* were more resistant than that to Tocoblend and than that with the HE1 was most resistant opposite forced oxidation.

Sensory metrology was made by the assessors of the margarinery of Cévitel and could describe the margarines as being homogeneous, of color, savour and odor acceptable and appreciated.

---

**Key words:** essential oil, *Citrus limon*, cold expression, hydrodistillation, antioxidant activity, Tocoblend, margarine, forced oxidation.