

**PRESERVATION DU CONCENTRE DE TOMATE PAR UN AGENT
ANTIFONGIQUE (HUILE ESSENTIELLE DU CITRON)****Himed L^{1*}, Merniz S², Benbraham M¹, Boudjouada E¹ et M Barkat¹**

*Corresponding author email: louiza.himed@umc.edu.dz

¹Laboratoire de biotechnologie et qualité des aliments (BIOQUAL), INATAA, Université des Frères Mentouri Constantine. 25000 Constantine, Algeria

²Institut of Industrial Hygiene and Safety University Batna 2, Algeria



RESUME

Les huiles essentielles ont des molécules naturelles considérées comme antioxydants, antimicrobiens servant comme conservateur naturel pour préserver l'aliment des différentes altérations. Cette étude a pour objectifs de valoriser les écorces de *Citrus limon* de la variété « Eureka » par extraction de ses huiles essentielles, d'évaluer *in vitro* l'activité antifongique de ces huiles extraites par deux modes: hydrodistillation (HEH) et pression à froid (HEP), et enfin les appliquer au concentré de tomate. Le rendement moyen en huile essentielle extraite par hydrodistillation est de $2,20 \pm 0,773\%$ et celui de l'huile extraite par pression à froid est de $0,87 \pm 0,025\%$. La composition de ces huiles a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). Les résultats nous ont permis d'identifier 30 constituants représentant 97,81% et 97,42% de l'huile essentielle totale HEH et de celle de HEP, respectivement. Les composants principaux étaient le limonène suivi du α -pinène et de γ -terpinène. Le test de l'activité antifongique des huiles essentielles du citron a été réalisé par la méthode des aromagrammes et a montré que cette huile possède une activité antifongique plus au moins intéressante. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été estimées par la méthode de dilution d'agar. Les souches fongiques telles que *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Fusarium oxysporum* et *Fusarium culmorum* ont révélé une nette sensibilité vis-à-vis des huiles extraites avec des CMI qui varient entre 350 et 600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour HEH et entre 180 à 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour HEP. Ces résultats ont été confirmés par l'application des huiles HEH et HEP au concentré de tomate qui a présenté une meilleure résistance à la contamination fongique par rapport au témoin (sans huiles essentielles) révélant une modification de couleur (le rouge vire vers le marron). L'application de ces huiles essentielles au concentré de tomate nous a permis de déduire que cette huile limite l'altération par les moisissures et le conserve un peu longtemps (deux mois).

Mots clés: Concentré de tomate, *Citrus limon*, huiles essentielles, activité antifongique

ABSTRACT

Essential oils have natural molecules considered as antioxidants, and antimicrobial substances serving as natural preservatives used to preserve the food from various alterations. The objectives of this study were to enhance the use of *Citrus limon* peel of the "Eureka" variety by extracting its essential oils, to evaluate *in vitro* the antifungal activity of these oils extracted by two methods: hydrodistillation (HEH) and cold pressure (HEP), and finally apply them to the tomato concentrate in order to see their effect on fungi (molds). The average yield of essential oil extracted by hydrodistillation is $2.20 \pm 0.773\%$ and that of the oil extracted by cold pressing is $0.87 \pm 0.025\%$. The composition of these oils was analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC / MS). The results allowed us to identify 30 constituents representing 97.81% and 97.42% of the total essential oil HEH and that of HEP, respectively. The main components were limonene followed by α -pinene and γ -terpinene. The test of the antifungal activity of essential oils of lemon has been carried out by the aromagrammes method; it showed that this oil has an antifungal activity. Minimum inhibitory



concentrations (MIC) were estimated by the agar dilution method. The fungal strains (molds) *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Fusarium oxysporum* and *Fusarium culmorum* revealed sensitivity to extracted oils with MICs that vary between 350 and 600 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for HEH and between 180 and 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for HEP. These results were confirmed by the application of HEH and HEP oils to tomato concentrate, which showed better resistance to fungal contamination compared to the control (without essential oils) revealing a change in color (red turns to brown). The application of these essential oils to tomato concentrate has allowed us to deduce that this oil limits the damage caused by molds and keeps it safe for about two months.

Key words: Tomato concentrate, *Citrus limon*, essential oils, antifungal activity



INTRODUCTION

Les aliments sont exposés à la détérioration par les bactéries et les moisissures et subissent des modifications du goût, de leur couleur et par conséquent la perte de la quantité des nutriments et de la sécurité de ces aliments [1]. En raison de leur efficacité et de leur application facile et pratique, l'utilisation des produits chimiques constitue la technique la plus utilisée pour lutter contre les moisissures nuisibles [2].

Cependant, l'emploi intensif et inconsidéré de ces produits a provoqué une contamination de la biosphère et de la chaîne alimentaire, une éradication des espèces non cibles et l'apparition des microorganismes résistants. Ces dangers ont conduit l'organisation mondiale de la santé (OMS) à interdire l'usage de certains fongicides chimiques [3].

Parmi les métabolites secondaires des végétaux, les huiles essentielles sont les plus étudiées et ont suscité, ces dernières années, un intérêt croissant dans de nombreux domaines pharmaceutique, agroalimentaire et cosmétique, notamment par leurs propriétés antioxydantes et antimicrobiennes [4]. La dynamique de marché des huiles essentielles est soutenue par une demande sans cesse croissante en ingrédients naturels, ce qui a poussé les industriels des secteurs agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique davantage à les intégrer dans leurs formulations. La substitution d'un produit de synthèse par une huile essentielle permet d'accroître la valeur ajoutée [5].

Cette étude a pour objectifs d'extraire les huiles essentielles du zeste de *Citrus limon* de la variété «Euréka», d'évaluer *in vitro* l'activité antifongique de ces huiles et de les appliquer sur le concentré de tomate.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles de zestes de *Citrus limon* de la variété *Euréka* ont été extraites par pression à froid et par hydrodistillation [6].

Microorganismes utilisés

Les moisissures utilisées pour cette étude sont au nombre de 6 souches fongiques ; *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Fusarium oxysporum* et *Fusarium culmorum*.

Ces souches ont été obtenues auprès du laboratoire de génie microbiologique et applications de l'Université des Frères Mentouri Constantine (UFMC).

Concentré de tomate

Un concentré de tomate a été utilisé comme étant une matrice alimentaire pour appliquer les huiles essentielles extraites et suivre sa contamination par les moisissures.



Analyse des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)

Les huiles essentielles ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC / MS) (en utilisant une colonne DB-5 capillaire en silice fondue polaire (30 mx 0,25 mm, épaisseur du film de 0,25 µm). Le programme de température du four était de 60°C et maintenu pendant 8 minutes, puis augmenté de 45 à 250°C à une vitesse de 2°C / minute qui était maintenue à 250°C pendant 20 minutes. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur à un débit constant de 3 ml / min. La température de l'injecteur et de la conduite de transfert MS a été réglée à 250°C et 280°C, respectivement. Des échantillons (0,2 µl) ont été injectés à 250°C selon un rapport de scission de 50:1. L'identification des constituants a été effectuée par comparaison des indices de rétention (indices de Kovats) et des spectres de masse (ions-fragments) obtenus expérimentalement par rapport à ceux cités dans la littérature [7] et/ou inventoriés dans les banques de bibliothèques spectrales (Wiley7 et Nist 2002).

Test antifongique

Test de sensibilité : selon Hussain *et al.* [8] un volume de 20ml de SDA (Sabouraud Dextrose Agar) a été versé aseptiquement dans des boîtes de Pétri. Après solidification, 100µl de la suspension fongique à tester ont été étalés en surface (10^6 spores.ml⁻¹). A l'aide d'une pince stérile, un disque préalablement stérilisé a été déposé sur la surface de la gélose (3 disques/boîtes), et imbibé avec 5µl des huiles essentielles. Les boîtes de Pétri ont été maintenues à 4°C pendant une heure pour que les huiles essentielles puissent diffuser [9]. Ensuite l'incubation a été effectuée à (30°C /2 à 7jours) [10]. La détermination de l'activité antifongique a été estimée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour des disques, induit par les huiles essentielles testées. Selon [11], les souches sont dites résistantes pour un diamètre < 8mm, sensible (+) pour un diamètre entre 8 à 14mm, très sensible (++) pour un diamètre entre 15 à 19 mm et extrêmement sensible (+++) pour un diamètre >20m.

Concentrations minimales inhibitrices : pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI), nous avons employé la méthode de dilution d'agar rapportée par Matasyoh *et al.* [12]. Où un volume de 20 ml de SDA additionné de 0,5% (v/v) de tween 80 ont été mis dans des tubes à essai. Différentes concentrations d'huiles essentielles préparées dans le diméthyle sulfo-oxyde (DMSO, 50µl/ml - 1000µl/ml) ont été ajoutées aseptiquement et le mélange a été coulé dans des boîtes de Pétri. Après solidification de la gélose, 1µl (10^5 UFC) de souches fongiques a été mis dans les boîtes contenant le milieu Sabouraud. Les géloses avec 0,5% (v/v) de tween 80 et sans huiles essentielles, ont été utilisées comme contrôles positifs. Les boîtes de pétri ont été incubées à l'étuve à 30°C pendant 72 heures.

Application de l'huile essentielle sur le concentré de tomate

L'ajout de l'huile essentielle a été effectué après mise du concentré de tomate en petits flacons en verre stériles. Un témoin du concentré de tomate sans huile essentielle a été préparé. Le choix des doses de l'huile essentielle a été effectué selon les résultats de la CMI. Les flacons ont été maintenus à 4°C à l'abri de la lumière.



Analyse statistique

Les résultats ont été traités à l'aide du logiciel XLSTAT 2009, (test de Student), avec un $\alpha = 0,05$ qui permet de déterminer la significativité entre les échantillons d'huiles essentielles.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le rendement d'extraction en huiles essentielles de *Citrus limon* «Euréka» obtenues par hydrodistillation (HEH) est de $2,20 \pm 0,773\%$ et celui obtenues par pression à froid (HEP) est de $0,87 \pm 0,025\%$. Le test de Student a montré une différence significative ($p < 0,05$) entre les deux rendements. Ce qui concorde avec les données de [13], où le rendement d'extraction par hydrodistillation est plus important que celui d'extraction par pression à froid, et cela est expliqué par l'intervention de la chaleur dans l'extraction par hydrodistillation qui a facilité l'éclatement des poches sécrétrices.

Le Tableau 1 regroupe la composition qualitative et quantitative des huiles essentielles extraites. Au total, 30 composés ont été identifiés. Le limonène apparaît comme le constituant majoritaire. Il se présente avec un pourcentage de 61,26% pour HEH et 67,08 % pour (HEP). En deuxième position, ils apparaissent le α -pinène suivi du α -Citral puis du γ -terpinène.

D'après la littérature consultée, le nombre et le pourcentage des composés identifiés dans les huiles essentielles extraites des *Citrus* varie d'une étude à l'autre. Comme la plupart des constituants des huiles essentielles qui sont volatils et instables, il se pourrait que ces fluctuations soient dues, en plus des facteurs génétiques, aux conditions pédoclimatiques, d'extraction et de conservation. Selon Bakkali *et al.* [4], la composition chimique des huiles de *Citrus* diffère même d'une variété à l'autre. Ces mêmes auteurs ont identifié 25 à 60 composés dont le limonène est le composé majoritaire. Moufida et Marzouk [14] ont rapporté des teneurs en limonène de 45 à 75% des constituants détectés dans les huiles essentielles du citron. En effet, les propriétés chimique, physique et biologique de ces huiles essentielles sont fortement reliées à la teneur en ce composé.

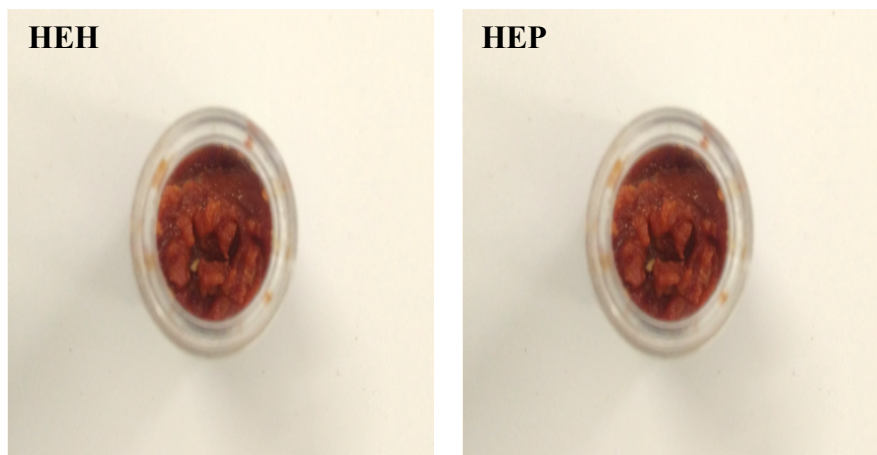
Pouvoir antifongique

Les résultats des diamètres d'inhibition et ceux de la concentration minimale inhibitrice des souches fongiques dites sensibles sont représentés dans le tableau 2.

D'après ces diamètres, toutes les souches fongiques testées sont sensibles vis-à-vis les huiles essentielles extraites (HEH et HEP). Les diamètres d'inhibition sont plus importants pour les souches testées par les huiles essentielles extraites par pression à froid par comparaison aux huiles essentielles extraites par hydrodistillation. Les CMI des huiles HEP sont moins importantes que celles des huiles HEH. Cela signifie une activité antifongique des huiles HEP plus intéressante que celle des huiles HEH. L'activité de ces huiles essentielles est liée sans doute à l'ensemble de leurs constituants. Les auteurs Dorman et Deans [15] ont signalé que l'activité antimicrobienne d'une huile essentielle est reliée essentiellement à ses composés majoritaires, mais sans négliger l'effet synergique des constituants mineurs. D'autres [16] ont attribué cette activité aux monoterpènes et sesquiterpènes. Selon Fisher et Phillips [17], l'activité antimicrobienne des terpènes est due essentiellement à leur interaction avec la membrane cellulaire.

Application de l'huile essentielle sur le concentré de tomate

Après l'application des huiles essentielles sur le concentré de tomate (CT) et l'observation visuelle, qui se fait chaque trois jour pendant une période d'un mois, montre qu'il n'y a aucun changement au niveau des échantillons sur lesquels les huiles essentielles sont appliquées, alors que le témoin (sans huiles essentielles) présente des modifications (figure 1): changement de couleur (rouge vire vers le marron), et une altération par les moisissures. Les huiles essentielles du citron que nous avons appliqué, ont luté contre toutes proliférations fongiques. Cela est dû à leur composition en composants antifongiques (limonène, linalol, et cetera) qui ont modifié les conditions de multiplication des microorganismes. Cela a confirmé l'activité antifongique déterminée par l'aromatogramme.



CT avec les huiles essentielles



CT sans huiles essentielles

Figure 1: Effet des huiles essentielles sur le concentré de tomate

CT avec HEH et CT avec HEP intacts

CT sans HEH et sans HEP altéré avec les moisissures (visible à l'œil nu)

CONCLUSION



Les principaux résultats obtenus montrent que l'hydrodistillation est le procédé ayant donné un meilleur rendement en huiles essentielles à partir du zeste de *Citrus limon* (*Euréka*). Un effet marquant du mode d'extraction a été enregistré sur la composition des huiles essentielles extraites, avec une dominance du limonène suivi de l' α -pinène, l' α -citral et le γ -terpinène. Concernant l'effet antifongique, toutes les souches testées ont montré une sensibilité aux huiles essentielles extraites. Les valeurs des CMI traduisent une activité antifongique non négligeable. L'application des huiles essentielles sur le concentré de tomate limite son altération par les moisissures et le conserve deux mois environ.

A l'essor de cette étude, il serait utile d'utiliser l'huile essentielle *Citrus limon* comme alternative au conservateur synthétique déjà employé dans l'industrie alimentaire.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique de l'Algérie pour son soutien financier.



Tableau 1: Composition chimique des huiles essentielles du citron analysées par GC/MS

N°	Composés	IR	Teneurs	
			HEH	HEP
Monoterpènes			78,98	83,31
1	α -thujene	931,196	0,24	0,33
2	α -pinene	938,610	9,65	11,01
3	β -pinene	981,766	1,47	1,60
4	β -myrcene	995,024	1,35	0,72
5	limonene	1045,348	61,26	67,08
6	β -ocimène	1056,486	0,13	0,09
7	γ -terpinène	1066,498	3,84	2,18
8	α -terpinolene	1108,546	0,19	0,19
9	cis α -bergamotène	1135,896	0,85	0,11
Monoterpènes oxygénés			11,04	10,17
10	linalool	1109,571	0,39	0,43
11	cis -limonene oxide	1138,187	0,13	0,79
12	cis-litronellol	1148,022	0,61	0,49
13	trans-citronellol	1149,254	0,78	0,73
14	camphor	1147,971	0,26	0,30
15	citronellal	1150,334	0,25	0,18
16	α -terpineol	1192	0,37	0,20
17	linalyl propionate	1199,414	1,07	0,12
18	trans-carveol	1231,182	0,20	0,24
19	cis-carveol	1244,105	0,20	0,11
20	cis-citral	1248,850	2,39	2,52
21	geranial	1279,198	0,17	0,52
22	α -citral	1248,850	4,22	3,54
Sesquiterpènes			3,76	1,21
23	β -élémane	1373,211	2,22	0,11
24	trans caryophyllène	1391,324	0,11	0,26
25	γ -cadinène	1501	1,21	0,68
26	germacrène	1477,154	0,22	0,16
Sesquiterpènes oxygénés			1,52	1,65
27	myristicine	1531,537	0,81	1,13
28	caryophyllene oxide	1584,603	0,71	0,52
Autrescomposés oxygénés			2,51	1,08
29	nerylacétate	1361,966	1,40	0,11
30	piperitenone oxide	1363,013	1,11	0,97
TOTAL			97,81	97,42

IR : Indice de rétention des composés identifiés

Tableau 2 : Diamètres des zones d'inhibitions (mm) et concentrations minimales inhibitrices (CMI) des huiles essentielles de *Citrus limon* vis-à-vis les souches testées

Souche testées	DI (mm)		CMI ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	
	HEH	HEP	HEH	HEP
<i>Aspergillus terreus</i>	11 \pm 0,09 ^a	12,8 \pm 0,03 ^b	640	500
<i>Aspergillus niger</i>	12,4 \pm 0,43 ^a	14,2 \pm 1,41 ^b	550	340
<i>Aspergillus flavus</i>	12,1 \pm 0,02 ^a	13,4 \pm 1,12 ^b	600	370
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	11,9 \pm 0,09 ^a	13,6 \pm 0,21 ^b	610	480
<i>Fusarium oxysporum</i>	13,8 \pm 0,06 ^a	17,8 \pm 0,03 ^b	350	180
<i>Fusarium culmorum</i>	13,6 \pm 0,32 ^a	16,7 \pm 0,03 ^b	380	250

DI : diameter d'inhibition en mm, CMI : concentration minimale inhibitrice en $\mu\text{g.ml}^{-1}$

Pour le même test, la même lettre signifie l'absence de différence significative au seuil $p < 0.05$

REFERENCES

1. **Janet V, Chahbal NJ et D Russell** Quantification and determination of chemical composition and determination of essential oil extracted from natural orange blossom water (*Citrus aurantium l, ssp. Aurantium*). *Journal of Applied Microbiology*.2005;**25**, 259-270.
2. **Magan N et M Olsen** Mycotoxines in food: Detection and control, *Woodhead*2004.
3. **Khelil MA** Influence de la chaleur utilisée comme moyen de lutte contre le bruché du haricot *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleopterae: Bruchidae) sur les différents états et stades de développement. *Thèse de doctorat. Agr. INA*1977, 77.
4. **Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D and M Idaomar** Biological effects of essential oils- A review. *Food Chem Toxicol*. 2008; **46**, 446-475.
5. **Kerdudo A, Dingas A, Fernandez X and C Faure** Encapsulation of rutin and naringenin in multilamellar vesicles for optimum antioxidant activity. *Food Chemistry*. 2014.12- 19.
6. **Bourgou S, Rahali FZ, Ourghemmi I and M Saidani Tounsi** Changes of Peel Essential Oil Composition of Four Tunisian Citrus during Fruit Maturation. *The Scientific World Journal*, 2012; 10.
7. **Adams RP** Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectroscopy. *Allured Publishing Corporation, Carol Stream*.1995.
8. **Hussain AI, Anwar F, Chatha SAS, Jabbar A, Mahboob S et PS Nigam** *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology* 2010; **41:1070-1078**.
9. **Rožman Tand B Jeršek** Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. *Acta agriculturae Slovenica*, 2009.**93(1)**, 51-58.
10. **Rasooli I, HadiFakoor M, Yadegarinia D, Gachkar L, Allameh A and M Bagher Rezaei** Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. 2008;**(122)**:135-139.
11. **Ponce AG, Fritz R, del Valle C and SI Roura** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol*. 2003; **36**:679-684.
12. **Matasyoh JC, Maiyo ZC, Ngure RM et R Chepkorir** Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. *Food Chemistry*, 2009;**113**:526- 529.

13. **Bachelot C, Blaise A, Corbel T et A Le Guernic** Les huiles essentielles: extraction et comparaison. *U.C.O Bretagne* 2006. 1-18.
14. **Moufida S, and B Marzouk** Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochem.* 2003; **62**: 1283–1289.
15. **Dorman HJ et SG Deans** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, 2000; **88**: 308-316.
16. **Tajkarimi MM, Ibrahim SA et DO Cliver** Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 2010; **21**: 1199–1218.
17. **Fisher K et C Phillips** Potentiel antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? A review. *Trends in Food Science and Technology*, 2008;**19**: 156-164.