



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريريج

Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.

كلية علوم الطبيعة و الحياة و علوم الأرض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologiques



Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Alimentaires

Spécialité : Qualité des produits et sécurité alimentaire

Thème

Utilisation de l'extrait des écorces de grenades (*Punica granatum*) pour prolonger la durée de conservation d'un jus d'orange frais

Présenté par: -AISSAOUI Imane

-DAHMOUNI Amira

Devant le jury :

Président : Dr. T. BOUBELLOUTA MCA (Univ: Mohamed El Bachir El Ibrahimi)

Encadreur: Dr. N. BENYOUCEF MCB (Univ: Mohamed El Bachir El Ibrahimi)

Examinatrice : M^{me}. S. HIHAT MAA (Univ: Mohamed El Bachir El Ibrahimi)

Année universitaire : 2020/2021

Abstract

This study evaluated the possibility to use pomegranate byproduct, essentially peel powder as a conservative agent for fruit juice. The extraction of actives compounds of *Punica Garantum* peels was made by maceration with ethanol and the evaluation of antioxidant and antimicrobial activity were conducted using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine (DPPH) radical scavenging and disk diffusion method in agar medium for in vitro study, while self-life tests of orange juice monitoring the pH, titrable acidity, cloud value, browning index and total mesophilic germs for in vivo experiments. The in vitro results highlighted that pomegranate peels extract (PPE) showed a higher phenol and flavonoid content and strong antioxidant activity with an IC₅₀ of 6.22 µg / ml, as well as the antimicrobial activity indicated a higher inhibitory effect. Furthermore, in vivo experiments carried out with a negative control (without PPE) and a positive Control (with citric acid) showed a significant effect (p<0,05) on Browning index, and lowering of microbial growth during storage compared to the controls, while pH, TSS (°Brix) and cloud value are not affected. The data suggested that pomegranate peel extract in orange juice was effective in prolonging it shelf life and allow us to consider PPE as a potential conservator for sustainable food.

Keywords:

Pomegranate peels extract; Natural conservator; Orange juice; Sustainable food.

قيمت هذه الدراسة إمكانية استخدام منتج ثانوي من الرمان ، مسحوق قشر أساسي كعامل محافظ لعصير الفاكهة. تم استخلاص المركبات النشطة من قشور *Punica Garantum* عن طريق النقع بالإيثانول وتم إجراء تقييم نشاط مضادات الأكسدة ومضادات الميكروبات باستخدام طريقة الكسح الجذري وانتشار القرص في وسط أجار (دراسة في المختبر) ، في حين أن اختبارات الحياة الذاتية لعصير البرتقال ترصد الرقم الهيدروجيني ، والحموضة المعيارية ، وقيمة العكارة ، ومؤشر التحمير ، وإجمالي الجراثيم. أظهرت النتائج في المختبر أن مستخلص قشور الرمان (PPE) أظهر محتوى أعلى من الفينول والفلافونويد ونشاطاً قوياً مضاداً للأكسدة مع تركيز IC_{50} يبلغ 6.22 ميكروجرام / مل ، بالإضافة إلى أن النشاط المضاد للميكروبات يشير إلى تأثير مثبط أعلى. علاوة على ذلك ، أظهرت التجارب التي أجريت على العصير باستخدام عينة سلبية (بدون إضافة مستخلص قشور الرمان) وعينة إيجابية (مع حامض الستريك) تأثيراً معنوياً ($P<0,05$) على مؤشر التحمير ، وخفض نمو الميكروبات أثناء التخزين. ، بينما لا يتأثر الرقم الهيدروجيني و TSS (درجة بريكس) وقيمة العكارة. تشير البيانات إلى أن مستخلص قشر الرمان في عصير البرتقال كان فعالاً في إطالة العمر الافتراضي له ، ويسمح لنا بالنظر إلى معدات الوقاية الشخصية كواقي محتمل للأغذية المستدامة.

الكلمات المفتاحية :

مستخلص قشور الرمان. حافظ طبيعي. عصير البرتقال. الغذاء.

Résumé

Cette étude a évalué la possibilité d'utiliser un sous-produit de grenade, essentiellement de la poudre d'écorce comme agent conservateur pour les jus de fruits. L'extraction des composés actifs des écorces de *Punica garantum* a été réalisée par macération à l'éthanol et l'évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne a été réalisée en utilisant la méthode de piégeage des radicaux 1,1-diphényl-2-picrylhydrazine (DPPH) et de diffusion sur disque en milieu gélosé pour des études *in vitro*, tandis que des tests d'auto-vie du jus d'orange surveillent le pH, l'acidité titrable, la valeur trouble, l'indice de brunissement et les germes mésophiles totaux pour des expériences *in vivo*. Les résultats *in vitro* ont mis en évidence que l'extrait d'écorces de grenade (PPE) présentait une teneur plus élevée en phénols et flavonoïdes et une forte activité antioxydante avec une IC_{50} de 6,22 g/ml, ainsi que l'activité antimicrobienne indiquait un effet inhibiteur plus élevé. De plus, des expériences *in vivo* réalisées avec un contrôle négatif (sans PPE) et un contrôle positif (avec acide citrique) ont montré un effet significatif ($p < 0,05$) sur l'indice de brunissement, et une diminution de la croissance microbienne au cours du stockage par rapport aux contrôles, tandis que le pH, le TSS (°Brix) et l'indice de turbidité ne sont pas affectés. Les données suggèrent que l'extrait de zeste de grenade dans le jus d'orange est efficace pour prolonger sa durée de conservation et nous permettent de considérer l'PPE comme un conservateur potentiel pour une alimentation durable.

Mots clés :

Punica garantum – PPE – Conservateur naturel – Stabilité – Jus d'orange

Remerciement

On remercie **Allah Soubhano wa Taala** tout puissant miséricordieux de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour réaliser ce travail.

On tient à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de notre travail et qui nous ont aidés lors de la réalisation de ce mémoire :

On voudrait dans un premier temps remercier, Notre encadreur de mémoire **Dr. Nabil BENYOUCEF**, professeur à l'université de Bordj Bou Arreridj, non seulement pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, mais aussi pour sa sagesse avec nous qui a contribué à alimenter notre réflexion.

On adresse nos remerciements les plus sincères à **Dr. Tahar BOUBALOUTA** pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury.

On tient à remercier profondément **Mme Soriya HIHAT** d'avoir acceptée d'examiner notre travail.

Nos vifs remerciements vont également à **Dr. Raouf AMARA KORBA** et **Dr. Nouredine TOUATI**, qui nous ont beaucoup appris sur les défis à relever dans le monde scientifique, ils ont partagés leurs connaissances et expériences pendant toute la période de nos études et avoir répondu à tous nos questions.

Notre remerciement à **Dr. Zinedine FALLAHI**, pour son aide à réaliser la partie statistique de ce mémoire.

On remercie également toute l'équipe pédagogique de l'université de Bordj Bou Arreridj et les responsables des laboratoires de la faculté « **Khalil, Sabrina, Ismahan, Wahiba, Wassima ... etc** » pour avoir assurés la partie pratique de celle-ci.

Le plus grand remerciement à **nos parents**, pour leur coopération financière et morale constante pendant nos études et leurs encouragements.

D é d i c a c e

Je dédie ce mémoire,

À :

Mes chers parents,

« **Amor** » « **Zahra** » Merci pour votre soutien et votre confiance.

Mes chers frères et chères sœurs,

« **Abdelghani, Tayeb, Raouf, Sara, Samia** », Merci pour vos encouragements.

Mon petit ange,

« **Yasmine** » tous ce que je suis maintenant est grâce à ta présence dans ma vie.

Ma copine,

« **Amira** » Merci pour ta patience, t'amitié, pour tous moments merveilleux que j'ai passée avec toi.

À **toute personne** qui m'a encouragée pour pouvoir continuer le rêve qui n'était pas bien réalisé.

Imane

D é d i c a c e

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, je dédie ce modeste travail, fruit de mes études en exprimant ma profonde gratitude à tous mes proches particulièrement :

A ma chère mère

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurais point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta patience à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

A mon cher père

Qui m'a orienté vers le chemin de la triomphe, avec son soutien morale et matériel, sa patience, ses encouragements et ses sacrifices, tu as toujours été à mes côtés

A mon cher oncle Messaoud une dédicace spécial pour indéfectibles soutiens et qui m'a aidé et supporté dans les moments difficiles sans oublié sa femme ma tante Nejud .

A mes adorables sœur Alae, Takwa et ma poupée Roufia qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.

A mes grands-parents maternel, que dieu leur donne une longue et joyeuse vie.

Je remercie chaleureusement **mon binôme Imane** pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.

A mon fiancé chakib qui ma toujours encouragé et as été à mes côté tout le temps.

A toute ma belle-famille, yamma , baba et salma que dieu leurs donne une longue et joyeuse vie.

A tous mes amies **hadil, Inas, chaima et kelthome** et mes enseignants.

Amira

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

INTRODUCTION	1
1 MATERIEL ET METHODES	3
1.1 PREPARATION ET EXTRACTION DES COMPOSES BIOACTIFS	3
1.2 DOSAGE DES COMPOSEES PHENOLIQUES	3
1.3 ESSAI DE BIO-CONSERVATION IN VITRO	3
1.3.1 Détermination de l'activité antioxydante	3
1.3.2 Essai de l'activité antimicrobienne	4
1.4 ESSAI DE BIOCONSERVATION IN VIVO	4
1.4.1 Extraction et préparation du jus d'orange	4
1.4.2 Analyses physico-chimiques	5
1.4.2.1 TSS (Degré °Brix) et pH	5
1.4.2.2 Acidité titrable	5
1.4.2.3 Indice de trouble	5
1.4.2.4 Indice de brunissement	5
1.4.3 Analyse microbiologique.....	6
1.4.4 Analyse des données	6
2 RESULTATS ET DISCUSSION	7
2.1 COMPOSITION PHENOLIQUE DES ECORCES DE GRENADES	7
2.2 ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET ACTIVITE ANTIMICROBIENNE	7
2.2.1 Activité antioxydante	7
2.2.2 Activité antimicrobienne	8
2.3 EFFET DE L'EXTRAIT DES ECORCES DE GRENADES SUR LA DUREE DE CONSERVATION DU JUS D'ORANGE	9
2.3.1 Effet sur le pH, et le °Brix	10
2.3.2 Effet sur l'acidité titrable	10
2.3.3 Effet sur l'indice de brunissement	11
2.3.4 Effet sur la turbidité	12
2.3.5 Effet de PPE sur la qualité microbiologique	13
CONCLUSION	15
ANNEXE	21

Liste des abréviations

Pg : *Punica garantum*

PPE : Pomegranate Peel Extract

BHT : Butyl HydroxyToluène

TBHQ : Tert-Butyl HydroQuinone

ESV : Emballage Sous Vide

EA : EmballageAérobic

TBARS : ThiobarbituricAcide Reactive Substances

LDL : Low Density Lipoprotein

AFNOR : Association Française de Normalisation.

BI : Indice de Brunissement.

EAG : Equivalent Acide Gallique

EQ : Equivalent Quercétine

FTAM : Flore Total Arobic Mésophile.

G : Gravité.

GN : Gélose Nutritif.

Mm : Millimètre.

MS : Matière Sèche

NaOH : Hydroxyde de Sodium.

pH : Potentiel Hydrogène.

PPE :Pomegranate Peel Extract

Ppm : Partie Par Million

T: Température.

TSS: Totale des solides solubles.

UFC: Unité formant colonies.

UV: Ultra-violet.

C° : Degré Celsius

% : Pourcentage

BNE : Brunissement Non Enzymatique

CV : Coefficient de Variation

Liste des tableaux

- Tableau 1 :** Composition en polyphénols totaux et en flavonoïdes de l'extrait éthanolique des écorces de grenades (Moy \pm SD).....7
- Tableau 2 :** Diamètre des zones d'inhibition (mm) de différentes souches microbiennes testées ...9
- Tableau 3 :** Effet de l'ajout de l'extrait phénolique de « Punica garantum », sur les différents paramètres physico-chimique (pH, acidité, °Brix, indice de brunissement, et indice de trouble) du jus d'orange.....10
- Tableau 4 :** Effet de l'ajout de l'extrait phénolique de « Punica garantum », sur la qualité microbiologique du jus d'orange.....14

Liste des figures

- Figure 1 :** Activité antioxydante par piégeage du radical 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) de l'extrait des écorces de grenades (chaque valeur est présentée par une moyenne \pm SD).....8
- Figure 2 :** Effet de l'extrait de PPE sur l'acidité titrable d'un jus d'orange naturel.....11
- Figure 3 :** Effet de PPE sur l'indice de brunissement de jus d'orange.....12
- Figure 4 :** Effet de PPE sur la turbidité du jus d'orange au cours de la conservation.....13
- Figure 5 :** Evolution des germes aérobies mésophiles totaux dans le jus d'orange durant le stockage à température ambiante. Les résultats sont présentés comme Moyenne \pm SD (n=2), la ligne horizontale représente la limite d'acceptabilité d'un jus de fruit frais non pasteurisé (10^5 UFC/ml).....13

INTRODUCTION

Introduction

Les jus d'agrumes essentiellement le jus d'orange est la boisson prédominante à travers le monde (Cortes et al., 2008). Le jus frais se détériore rapidement après extraction, due aux enzymes endogènes et à la croissance microbienne provenant de la contamination des fruits au cours de la chaîne de fabrication (Maherani et al., 2019 ; Mahale et al., 2008). Bien que les conservateurs chimiques tel que l'acide citrique et le benzoate de sodium restent le moyen de conservation le plus répandu, il y'a un intérêt croissant pour la recherche d'alternatives biologiques n'ayant pas des effets néfastes sur la santé du consommateur et qui contribuent à l'amélioration des propriétés organoleptiques et nutritionnelles des jus frais (Hassoun et al., 2020).

En raison de ces problèmes de sécurité alimentaire, une attention particulière a été accordée au développement et à l'utilisation effective d'antioxydants non toxiques d'origine naturelle (Nahas, 2012). En outre, les antioxydants naturels tels que les polyphénols, les tocophérols et les huiles essentielles ont été explorés en grande partie à partir de déchets de fruits et légumes, qui sont les matières les plus abondantes parmi les produits alimentaires et qui représentent environ 10 à 35% de la masse brute (Rao et Rathod, 2019). La valorisation de ces déchets constitue en plus de leurs effets bénéfiques à travers une alimentation biologique, des rentes potentielles pour un développement durable.

Le grenadier ou « *Punica granatum* » fait partie des espèces médicinales et alimentaires, le fruit est composé de quatre parties essentielles à savoir : l'épicarpe et le mésocarpe appelés communément le zeste qui est non consommable, tandis que l'endocarpe constitué de sacs à jus et de graines (appelées Balausta) sont la partie consommable du fruit (Melgarejo et al., 2020). Le zeste des grenades représente environ 50 % du poids total du fruit et est une source importante de minéraux, en particulier de potassium, de calcium, de phosphore, de magnésium et de sodium, des polysaccharides complexes et des niveaux élevés d'une gamme variée de composés bioactifs (Singh et al., 2018). Il est considéré comme la plante la plus riche en composés bioactifs tels que les acides phénoliques, les tanins, les flavonols et les anthrocyanine (Li et al., 2016 ; Masci et al., 2016). Cette composition lui a attribué plusieurs propriétés aussi bien dans le domaine médical que dans le domaine agroalimentaire (Kandyliis et al., 2020)

L'application des grenades et ces dérivés dans le domaine agro-alimentaire a fait l'objet de travaux de recherches, qui ont tenté d'évaluer leurs activités anti-oxydante et antimicrobienne (Panza et al., 2021 ; Salgado et al., 2012 ; Kanatt et al., 2010). En effet, Konsoula (2016) ;

Introduction

El-Hadary et Taha (2019) rapportent que l'extrait des écorces de grenades permet une meilleure stabilité à l'oxydation d'une huiles alimentaires comparativement au BHT (butyl hydroxytoluène) et au TBHQ (tert-butyl hydroquinone), ainsi les échantillons contenant l'extrait des écorces de grenades conservent bien leurs capacités anti-oxydantes pour une longue période, sous des conditions accélérées d'oxydation, ce qui indique que ces extraits contiennent des antioxydants offrant une meilleure protection. Les travaux de **Moghadam et al. (2020)** ont montré que l'incorporation de différentes doses d'extrait des écorces des grenades (PPE) avec les protéines du haricot donne un film comestible bio-fonctionnel pour l'emballage des produits alimentaires, avec une bonne souplesse permettant ainsi d'augmenter l'épaisseur et la perméabilité à la vapeur d'eau et de baisser l'humidité des aliments emballés. L'activité antimicrobienne et antifongique du zeste des grenades a fait également l'objet de beaucoup de travaux de recherches (**Panza et al., 2021 ; Tehranifar et al., 2011 ; Ismail et al., 2016 ; Ali et al., 2019**) qui ont montré son efficacité sur un large spectre d'agent pathogènes d'origine alimentaire tel que *Escherichia coli*, *Fusarium sambucinum*, *Penicillium italicum*, and *Bacillus subtilis*. En effet, **Dahham et al. (2010)** ont montré que l'activité antimicrobienne du zeste des grenades est meilleure par rapport à celles des pépins et du jus entier.

Les travaux de recherches signalés par la littérature scientifique essentiellement pour le domaine des boissons ont été concentrés uniquement sur le potentiel antioxydant et antimicrobien des écorces et des pépins des grenades (**Trigo et al., 2020 ; Viuda-Martos et al., 2013 ; Salgado et al., 2012**) sans aucune comparaison par rapport aux agents conservateurs utilisés à l'échelle industrielle ni un suivi des modifications physico-chimiques susceptibles d'être provoquées.

Dans ce contexte, le présent travail vise à montrer le potentiel de l'extrait des zestes de grenades comme succédané des conservateurs chimiques utilisés pour prolonger la durée de conservation des jus de fruits, essentiellement le jus d'orange frais, par un suivi des paramètres physico-chimiques et microbiologiques associés.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 Matériel et Méthodes

1.1 Préparation et extraction des composés bioactifs :

Les fruits sujet à la présente expérimentation ont été achetés au marché local (Bordj-Bou-Arréridj, Algérie). Les oranges et les grenades n'ayant pas de blessures ou de détériorations externes ont été lavés à l'eau de robinet pour éliminer tous résidu. Le zeste des grenades a été séparé manuellement du reste du fruit, puis séché au soleil et broyé par un moulin à café artisanal, afin d'obtenir une poudre d'une granulométrie réduite. Une quantité constante de poudre a été utilisée afin d'extraire les anti-oxydants naturels avec un mélange éthanol-eau distillée 1:1 (v/v) pendant 24 à 48h, suivant la méthode optimisée par **Venkataramanamma et al. (2016)**. L'extrait brut a été filtré sur papier Wattman de 45 μ m de diamètre, puis évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif, jusqu'à l'élimination totale du solvant.

1.2 Dosage des composées phénoliques :

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué selon la méthode de Folin-Ciocalteu (FC) rapportée par **Oleivera et al. (2014)** légèrement modifiée. Les polyphénols totaux ont été déterminés (en triplicata) par mélange de 0,4 ml d'extrait avec 0,4ml du réactif FC et 1,2 ml de Na₂CO₃ à 2 % (m/v). Le mélange est agité et incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant deux heures et l'absorbance est mesurée à 760 nm par un spectrophotomètre UV-visible (Perkin Elmer). Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique/gramme d'extrait en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (1 mg/ml ; R²= 0,978). La teneur en flavonoïdes totaux a été déterminée selon la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium décrite par **Cedola et al. (2017)**. 1 ml de solution méthanolique de chlorure d'aluminium à 2 % a été ajouté à 1 ml d'extrait, la solution est incubée pendant 15 mn à une température ambiante. Les absorbances sont lues à 430 nm au spectrophotomètre. Les concentrations des flavonoïdes contenus dans les extraits sont calculées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine comme standard (1mg/ml ; R²= 0,978), et les résultats sont exprimés en mg d'équivalent quercétine/ g d'extrait sec.

1.3 Essai de bio-conservation in vitro :

1.3.1 Détermination de l'activité antioxydante :

La détermination de l'activité antioxydante a été réalisée en utilisant le DPPH (2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle) comme substrat. Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des

Matériel et méthodes

antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH a été mesuré par la procédure décrite par **Brand-Williams et al. (1995)**.

Une solution méthanolique de 0,1 mM de DPPH (2 ml) est mélangée avec 1 ml de l'extrait dilué, puis le mélange est vortexer vigoureusement. Après une incubation de 30 minutes à l'obscurité, les absorbances ont été mesurées à 517 nm et le pourcentage du piégeage du radical DPPH a été calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Activité Antioxydante} = [(A_1 - A_2) / A_1] \times 100$$

A_1 : absorbance du contrôle (solution du DPPH sans extrait).

A_2 : absorbance de l'extrait.

La valeur de l'IC₅₀ a été déterminée en utilisant la régression linéaire de la courbe reliant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration ($\mu\text{g/ml}$) (**Martinez-Morales et al., 2020**).

1.3.2 Essai de l'activité antimicrobienne :

L'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique du zeste des grenades a été déterminée par mesure de l'effet inhibiteur suivant la méthode de diffusion sur milieu gélosé ou technique de l'aromatogramme, qui repose sur la mesure de la zone d'inhibition autour d'une source d'agent antimicrobien déposé à la surface d'un milieu de culture. A cet effet, deux souches bactériennes pathogènes (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*), et deux souches fongiques (*saccharomyces cerevisiae*, *Accromyces sp.*) isolées à partir d'un jus d'orange mis en conditions d'altération ont été utilisées. Dans une boîte de Pétri, à partir d'un point précis, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme, des disques de 6 mm de diamètre découpés dans du papier Wattamn N° 3, stériles sont déposés sur le gel. Un volume de 20 μl d'extrait est déposé sur les disques, avec une gamme de concentrations décroissantes de 300, 150, 75, 37,5, 18,75 et 9,37 $\mu\text{g/ml}$. La mesure de la zone d'inhibition aura lieu après incubation à 37°C pendant 24 heures (**Kanoun et al., 2014**).

1.4 Essai de bioconservation in vivo :

1.4.1 Extraction et préparation du jus d'orange :

Le jus d'orange a été choisi comme aliment pour les essais de bio-conservation, car il est relativement périssable et est sujette aux réactions de brunissement, ainsi que les altérations microbiennes. Des Oranges (*Citrus sinensis* L.) fraîchement récoltés en janvier 2021 ont été achetés sur un marché de fruits local (Bordj Bou Arreridj, Algérie), dont la maturité a été caractérisée par la couleur de la peau. Après un nettoyage rigoureux, les oranges ont été pressés en utilisant un extracteur de fruit domestique (Condor, Algérie), puis l'extrait éthanolique du zeste de

Matériel et méthodes

grenades a été rajouté au jus ainsi obtenu à des concentrations de 0.01, 0.02, 0.03 et 0.04 mg d'extrait/ ml de jus. Plus de ces échantillons, un témoin sans l'extrait (PPE) et un témoin avec de l'acide citrique à une concentration de 4,1 mg/ml (**Sébastien B., 2003**) comme conservateur ont été suivi pendant 18 jours (T°C~25), par mesure des paramètres physico-chimiques (pH, °Brix, acidité titrable, indice de brunissement et indice de trouble) et microbiologiques (Dénombrement des germes aérobies mésophiles).

1.4.2 Analyses physico-chimiques :

1.4.2.1 TSS (Degré °Brix) et pH :

Le pH des échantillons de jus d'orange traités et non traités a été mesuré en utilisant un pH-mètre numérique (modèle 420A, pH-mètre de paillasse Orion, Allometrics Inc.) et le TSS a été exprimé en ° Brix après détermination de l'indice de réfraction en utilisant un réfractomètre (Abbe 60, Bellingham + Stanley Ltd.).

1.4.2.2 Acidité titrable :

L'acidité a été déterminée par titrage des échantillons de jus (20 ml de jus + 80 ml d'eau distillée) avec la solution de NaOH 0,1 N et la phénolphthaléine (pH 8,2 ± 0,1) comme indicateur coloré. Le volume de NaOH a été converti en grammes d'acide citrique par 100 ml de jus et l'acidité titrable (TA) a été calculée en utilisant la formule suivante (**Aghajanzadeh et al., 2016**):

$$TA = \frac{V \times 0.1NNaOH \times 0.067 \times 100}{m}$$

Où V est le volume du titre de NaOH et m est la masse de jus d'orange (g).

1.4.2.3 Indice de trouble :

L'indice de trouble (Cloud value) d'un jus d'orange est liée au suspension de particules composée de protéines, pectines, lipides, hémicellulose, cellulose et autres composés mineurs (**Tiwari et al., 2008**). 5 ml de jus d'orange ont été centrifugés (Sigma 2-16P) à 756 g pendant 10 min à température ambiante (20,0 ± 0,5 ° C). L'indice de trouble a été mesurée en tant que l'absorbance du surnageant obtenu à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Unicam UV – Vis avec de l'eau distillée servant de blanc.

1.4.2.4 Indice de brunissement :

La détermination de l'indice de brunissement a été réalisée suivant la méthode décrite par **Martins et al. (2021)**. Le jus d'orange a été centrifugé à 824x g pendant 20 min (à 18°C), et le surnageant résultant a été dilué dans l'éthanol (1 :1 v/v), puis centrifugé de nouveau. L'indice de

Matériel et méthodes

brunissement correspond à l'absorbance du surnagent résultant à une longueur d'onde de 420 nm (Spectrophotomètre Unicam UV-visible).

1.4.3 Analyse microbiologique

Les germes aérobies mésophiles totaux ont été dénombrés par culture en surface sur gélose nutritif. Pour chaque prélèvement, jusqu'à six dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , ..., 10^{-6}) ont été effectuées avec toute précaution d'asepsie. Le dénombrement des germes totaux est effectué après 24 h d'incubation dans l'étude à une température de 37 C°. Les résultats ont été exprimés en logarithme décimal de l'unité formant colonie (UFC) par ml de jus d'orange tel que défini par la formule suivante (Berizi et al., 2016) :

$$\text{Log } 10 \text{ UFC/ml} = \left(\frac{\text{UFC}}{V \times \text{FD}} \right) \text{Log } 10$$

FD est le facteur de dilution et V est le volume de la prise d'essai.

La flore totale dénombrée est un indicateur majeur de la qualité microbiologique du jus d'orange.

1.4.4 Analyse des données :

Toutes les mesures ont été réalisées en triplicata et les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. Les données ont été soumises à une analyse de variance du test F en utilisant le système d'analyse statistique (SAS v.9.2- Institute Inc., Cary, NC), avec le test de Tukey complémentaire avec un niveau de signification $P < 0,05$ par rapport aux moyennes.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Résultats et discussion

2 Résultats et discussion :

2.1 Composition phénolique des écorces de grenades :

Les résultats de la détermination des polyphénols totaux et des flavonoïdes (Tableau 1) montrent que les écorces des grenades ont une teneur en composés phénoliques de 87,63 mg EAG/g dont les flavonoïdes représentent 22,00 mg EQ/g. Ces résultats se rapprochent de ceux rapportés par **Zaki et al. (2015)** qui ont trouvé une teneur de 113,26 mg EAG/g de composés phénoliques pour l'extrait méthanolique, par contre **Viuda-Martos et al. (2012)** ont signalé des teneurs de 46.58–54.84 mg GAE/g. **Li et al. (2006)** ont rapportés que les flavonoïdes représentent seulement une petite partie des polyphénols présent dans l'extrait d'écorces de grenade, ce qui a été confirmé par nos résultats. Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires, assurant en plus de leur rôle dans la couleur et la maturité du fruit, une fonction d'agent antioxydant in vitro et in vivo.

Tableau 1 : Composition en polyphénols totaux et en flavonoïdes de l'extrait éthanolique des écorces de grenades (Moy \pm SD).

Echantillon	Polyphénols totaux (mg EAG/g PEG)	Flavonoïdes (mg EQ/g PEG)
PEG	87,6 \pm 0,45	22,00 \pm 0,20

EAG : Equivalent acide gallique ; EQ : Equivalent quercitine ; PEG : Poudre des écorces de grenades.

2.2 Activité antioxydante et activité antimicrobienne :

2.2.1 Activité antioxydante :

L'activité anti-radicalaire ou antioxydante des écorces de « *Punica garantum* » a été mesurée on se basant sur le test du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH). Ce dernier est un radical organique qui subira une diminution de son absorbance à 517nm, lorsqu'il accepte un électron ou des espèces de radicaux libres (**Kaneria et Chanda, 2013**).

La concentration minimale inhibitrice (IC₅₀) représentant ainsi la concentration effective requise de l'agent antioxydant pour baisser la concentration initiale du DPPH de 50% a été déterminée à partir de la régression linéaire entre le pourcentage d'inhibition versus la concentration de l'extrait ($\mu\text{g/ml}$), avec une courbe à six points et un coefficient de corrélation $r^2 = 0,991$ (Figure 1). La valeur de l'IC₅₀ enregistrée est de 6,22 $\mu\text{g/ml}$, indiquant une forte activité antioxydante, qui est étroitement corrélée à la teneur en polyphénols totaux (**Konsoula, 2016**). En effet, la valeur de l'IC₅₀ obtenue pour la présente étude est très proche de celle rapportée par

Résultats et discussion

Kanatt et al. (2010) qui ont montré que l'activité antioxydante de l'extrait des écorces de grenades avec une IC_{50} de 4,9 $\mu\text{g/ml}$ est quatre fois plus faible que celle du BHA (IC_{50} de 21,2 $\mu\text{g/ml}$). La forte capacité de l'extrait des écorces de grenades à piéger le radical DPPH enregistrée pour la présente étude, indique qu'il a une bonne capacité à céder des atomes d'hydrogène pour un éventuel pouvoir antioxydant.

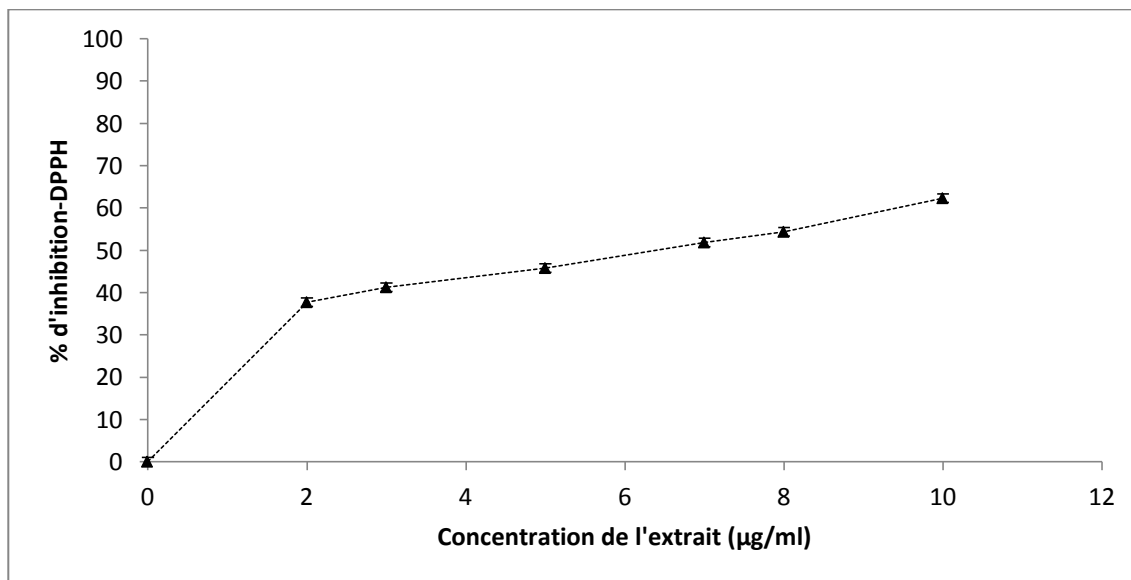


Figure 1 : Activité antioxydante par piégeage du radical 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) de l'extrait des écorces de grenades (chaque valeur est présentée par une moyenne \pm SD).

2.2.2 Activité antimicrobienne :

Les molécules bioactives d'origine végétal se sont avérées une bonne alternative aux molécules de synthèses employées pour la conservation des denrées alimentaires vis-à-vis de l'altération d'origine microbienne. L'activité antimicrobienne de l'extrait des écorces de grenades contre deux bactéries pathogènes (*Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*) et deux souches fongiques, isolées à partir d'un jus d'orange ayant subi une altération (*Saccharomyces cerevisiae* et *Ascomyces sp.*) a été étudiée en utilisant la méthode de l'aromatogramme, par mesure de la zone d'inhibition. Les résultats obtenus sont illustrés sur le tableau 2. Ces résultats montrent une variété d'effets inhibiteurs de l'extrait des écorces de grenade selon la souche bactérienne ou fongique utilisée. Il est à noter l'absence d'effet inhibiteur du PPE sur la bactérie *E.coli* contrairement au *Bacillus subtilis* où la zone d'inhibition est bien remarquable, avec un diamètre de 11,8 mm pour une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 37,5 $\mu\text{g/ml}$. Des résultats similaires ont été obtenus par **Kanatt et al. (2010)**, qui ont montré que l'extrait des écorces des grenades n'a pas d'effet inhibiteur sur les bactéries gram négatif (*E.coli*, *S. typhimurium*,

Résultats et discussion

Pseudomonas spp.), alors qu'une inhibition totale des bactéries gram positif a été obtenue pour des concentrations de l'ordre de 0,01%. D'autres recherches ont également rapporté que la plupart des extraits de plantes sont inefficaces contre les microorganismes gram positifs (Oliveira et al., 2008). Contrairement aux souches bactériennes, les souches fongiques utilisées pour la présente étude (*Saccharomyces cerevisiae* & *Accromyces sp.*) ont une sensibilité moins élevée à l'extrait, avec des zones d'inhibition de l'ordre de 17,5 mm, pour une concentration minimale inhibitrice de 150 µg/ml. Ces résultats sont concordance avec ceux signalés par Kanoun et al. (2014) qui ont montré que l'extrait des écorces de grenades inhibe la prolifération de *Rhodotorula sp.*, avec une zone d'inhibition de $29,5 \pm 0,5$ mm pour des concentrations $0,195 \leq \text{CMI} \leq 0,39$ mg/ml. En effet, l'activité antimicrobienne observée est due au faite que les extraits naturels de plantes contiennent un spectre de composés phénoliques, dont le mécanisme d'action sur les microorganismes est postulé comme étant due à la perturbation de la membrane cellulaire.

Tableau 2 : Diamètre des zones d'inhibition (mm) de différentes souches microbiennes testées

<i>Diamètre de la zone d'inhibition (mm)</i>						
Souche	Concentration (µg/ml)					
	300	150	75	37,5	18,75	9,37
<i>E.coli</i>	0	0	0	0	0	0
<i>B.subtilis</i>	28,9	26,7	24,5	11,8	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25,0	17,5	0	0	0	0
<i>Accromyces sp.</i>	25,0	17,5	0	0	0	0

2.3 Effet de l'extrait des écorces de grenades sur la durée de conservation du jus d'orange :

L'utilisation des extraits de plantes comme succédanés des conservateurs chimiques de synthèse, est devenue l'une des préoccupations du secteur agroalimentaire, de part la grande popularité de l'alimentation biologique. L'effet de l'extrait des écorces des grenades sur la durée de conservation du jus d'orange (à des concentrations de 0.01, 0.02, 0.03 et 0.04 mg d'extrait/ ml de jus) a été examiné, par un suivi des paramètres physicochimiques (pH, Acidité titrable, TSS (°Brix), Indice de trouble et l'indice de brunissement) et microbiologiques (charge microbienne

Résultats et discussion

totale) pendant 18 jours à température ambiante (~25°C). Les résultats obtenus après le traitement statistique des données sont regroupés sur le tableau 3.

Tableau 3 : Effet de l'ajout de l'extrait phénolique de « *Punica garantum* », sur les différents paramètres physico-chimique (pH, acidité, °Brix, indice de brunissement, et indice de trouble) du jus d'orange.

Echantillon	pH	Acidité	Brix°	Indice de brunissement	Indice de trouble
Témoin	3,76 ± 0,18 ^a	1,46 ± 0,18 ^b	1,343 ± 0,004 ^c	0,397 ± 0,093 ^a	0,198 ± 0,012 ^{bc}
Contrôle (+)	3,52 ± 0,22 ^c	1,52 ± 0,19 ^a	1,343 ± 0,004 ^b	0,234 ± 0,065 ^f	0,203 ± 0,014 ^b
D ₁ (0,01mg/ml)	3,60 ± 0,12 ^b	1,33 ± 0,08 ^c	1,344 ± 0,005 ^b	0,254 ± 0,053 ^d	0,202 ± 0,091 ^b
D ₂ (0,02mg/ml)	3,64 ± 0,18 ^{ab}	1,28 ± 0,11 ^f	1,344 ± 0,004 ^b	0,245 ± 0,075 ^e	0,187 ± 0,011 ^c
D ₃ (0,03mg/ml)	3,64 ± 0,16 ^{ab}	1,31 ± 0,11 ^d	1,344 ± 0,004 ^a	0,286 ± 0,032 ^b	0,170 ± 0,094 ^d
D ₄ (0,07mg/ml)	3,61 ± 0,13 ^{ab}	1,31 ± 0,09 ^e	1,344 ± 0,005 ^a	0,263 ± 0,058 ^c	0,227 ± 0,082 ^a
LSD	0.0568	0.0022	1.5092	0.0043	0.0078

*Les données sont les moyennes ± écart type. Les moyennes avec la même lettre dans une colonne ne sont pas significativement différentes (test de Tukey, P<0,05), avec 7 prélèvements de jus d'orange pour chaque dose.

2.3.1 Effet sur le pH, et le °Brix :

Les valeurs de pH et le °Brix des échantillons témoins étaient de 3,76 ± 0,18 et 1,343 ± 0,004, respectivement. L'addition de l'extrait phénolique de *Punica garantum* au jus d'orange n'a aucun effet significatif (P < 0,05) sur le pH et le degré Brix°, indépendamment de la dose et de la période de conservation (Tableau 3). L'absence d'effet observé est due probablement à la faible dose du PPE employée. Contrairement à nos résultats, **Trigo et al. (2020)** ont observé une augmentation du pH et du TSS suite à l'addition de PPE (5 mg d'extrait/ml) à un jus de carottes, mais aucune variation significative n'a été observée pendant la période de stockage (42 jours). Dans une étude portant sur l'utilisation de l'extrait des écorces de bananes (BPE) comme conservateur pour le jus d'orange, **Ortiz et al. (2016)** ont rapporté que l'addition du BPE n'a aucun effet significatif sur le pH et le TSS.

2.3.2 Effet sur l'acidité titrable :

D'après le tableau 3, l'addition du PPE à un jus d'orange à différentes doses à un effet significatif sur l'acidité titrable (P<0,05). En effet, des acidités moyennes de 1,46 ± 0,18^b (témoin), 1,52 ± 0,19 (contrôle positif), 1,28 ± 0,11^f (D1), 1,33 (D2) et 1,31 ± 0,11^d g d'acide citrique/100 ml de jus (D3 et D4) ont été enregistrées durant la période de conservation (figure 2). Cette différence d'acidité entre les témoins et les échantillons auxquelles des doses de PPE ont été rajouté est due probablement au blocage de la réaction de conversion des sucres en acides lactique

Résultats et discussion

par une inhibition de l'activité microbienne à l'aide de PPE, induisant ainsi une diminution de l'acidité titrable (Al-Zoreky, 2009). Des résultats similaires ont été rapportés par Sandhya et al. (2018), qui ont montré que l'addition de la poudre de PPE à un fromage blanc induit une diminution de l'acidité titrable.

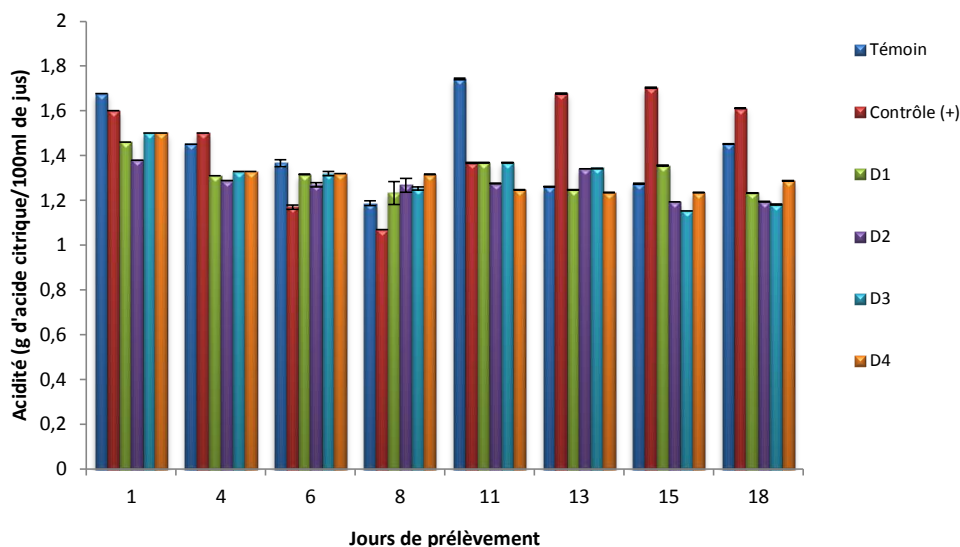


Figure 2 : Effet de l'extrait de PPE sur l'acidité titrable d'un jus d'orange naturel.

2.3.3 Effet sur l'indice de brunissement :

L'indice de brunissement est un paramètre utilisé pour suivre le brunissement non enzymatique des jus de fruits. D'après la figure 3, l'indice de brunissement a augmenté significativement ($P < 0,05$) durant la période de conservation pour le contrôle avec une absorbance moyenne de $0,397 \pm 0,093$, tandis que, pour les échantillons de jus auxquelles des doses de PPE d'acide citrique ont été rajoutées, l'indice de brunissement a légèrement augmenté durant la période de conservation, avec des indices de brunissement exprimés en absorbance à 420nm de $0,234 \pm 0,065^f$, $0,254 \pm 0,053^d$, $0,245 \pm 0,075^e$, $0,286 \pm 0,032^b$ et $0,263 \pm 0,058^c$ pour le contrôle positif, D1, D2, D3 et D4 respectivement. Cette différence observée est due probablement à l'action de l'acide citrique et de PPE contre la dégradation des anthocyanines, la dégradation de l'acide ascorbique et la réaction de Maillard qui provoquent l'augmentation de l'indice de brunissement (Dorris et al., 2018 ; Johnson et al., 1995). Le BNE était significativement influencée par la durée de conservation ($P < 0,001$) et le traitement par PPE ($P < 0,001$) avec un CV= 2,51%. Le brunissement non enzymatique est un processus conduisant à la dégradation des qualités organoleptiques et sensorielles chez la majorité de fruits, son inhibition contribue ainsi à l'augmentation de la durée de conservation.

Résultats et discussion

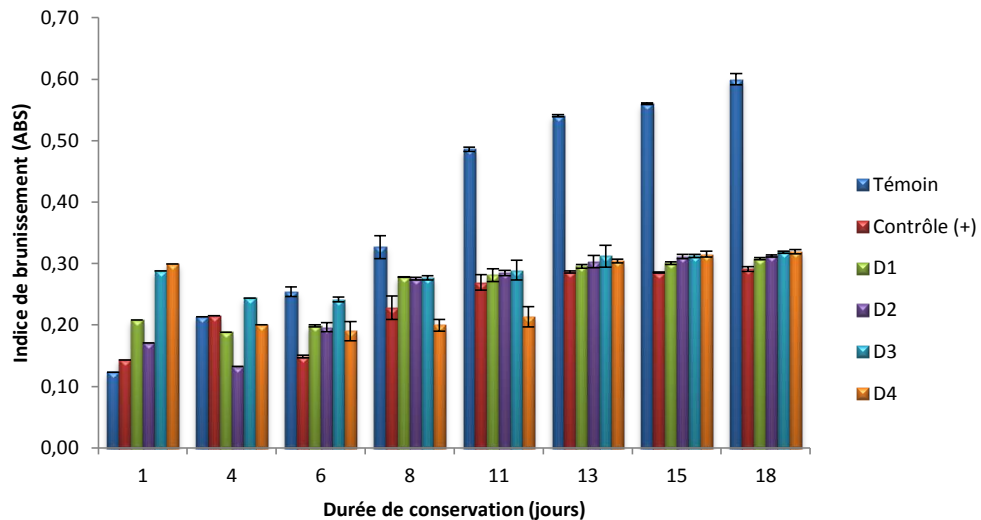


Figure 3 : Effet de PPE sur l'indice de brunissement de jus d'orange.

2.3.4 Effet sur la turbidité :

L'indice de trouble (Cloud value) d'un jus de fruit correspond à l'absorbance mesurée à 660 nm, elle est liée à la présence de particules de protéines, pectine, cellulose, hémicellulose et autres particules microscopiques. La figure 4 illustre l'évolution de l'indice de trouble du jus d'orange durant la période de conservation à différentes doses de PPE. La durée de conservation avait significativement influencé la turbidité du jus sans ordre cinétique ($P < 0,05$), alors que l'ajout de PPE n'a aucun effet significatif le trouble de jus. Ceci peut être expliqué par le fait que le PPE n'a aucun effet sur l'activité de la PME (Pectine méthyle estérase), la désestérification de la pectine méthoxylée a augmenté en raison de la forte activité de la PME. **Iftikhar et al. (2014)** rapportent que la turbidité de jus d'orange augmente avec l'inactivation de la PME, induisant ainsi une augmentation de l'indice de trouble.

Résultats et discussion

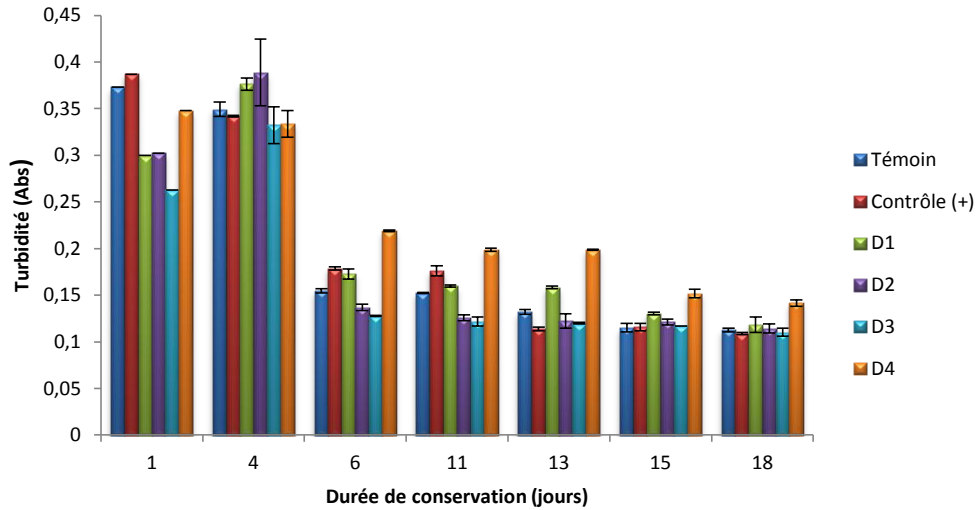


Figure 4 : Effet de PPE sur la turbidité du jus d'orange au cours de la conservation.

2.3.5 Effet de PPE sur la qualité microbiologique :

La qualité microbiologique des jus supplémentés avec le PPE a été déterminée par un suivi de l'évolution des germes aérobies mésophiles durant la période de conservation considérée (figure5).

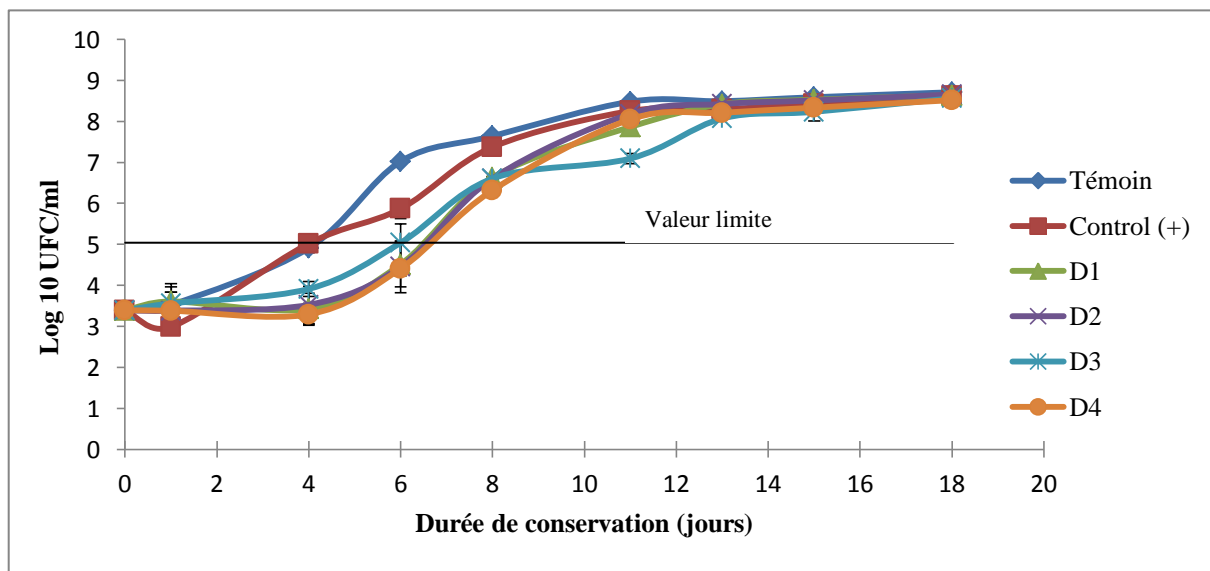


Figure 5 : Evolution des germes aérobies mésophiles totaux dans le jus d'orange durant le stockage à température ambiante. Les résultats sont présentés comme Moyenne \pm SD (n=2), la ligne horizontale représente la limite d'acceptabilité d'un jus de fruit frais non pasteurisé (10^5 UFC/ml).

Résultats et discussion

Durant les 18 jours de conservation, la concentration cellulaire des échantillons étudiés a graduellement augmenté. Toutefois, la concentration des GAM des échantillons témoin et contrôle positif a rapidement augmenté et a dépassé la limite microbiologique (10^5 UFC/ml) après 4 jours de stockage.

Tableau 4 : Effet du traitement par l'extrait phénolique de « *Punica garantum* », sur la qualité microbiologique de différents échantillons de jus d'orange naturel.

Echantillon	Log 10 UFC/ml
Témoin	6,75 ± 2,21 ^a
Contrôle (+)	6,46 ± 2,10 ^b
D ₁ (0,01 mg/ml)	6,11 ± 2,35 ^c
D ₂ (0,02mg/ml)	6,12 ± 2,4 ^d
D ₃ (0,03mg /ml)	6,05 ± 2,10 ^e
D ₄ (0,07mg/ml)	5,99 ± 2,35 ^f
LSD	1.056

* Les données sont les moyennes ± écart type. Les moyennes avec la même lettre dans une colonne ne sont pas significativement différentes (test de Tukey, P<0,005), 6 échantillon de jus d'orange naturel.

Les échantillons actifs ont montré une augmentation lente des germes aérobies mésophiles comparés aux témoins, avec une prolongation de la durée de validité microbiologique de 2 jours, quelque soit la concentration de PPE employée. Ces résultats suggèrent que PPE permet un ralentissement de la croissance microbienne. Des résultats similaires ont été rapportés par **Panza et al. (2021)**, qui ont montré le la poudre des écorces de grenades additionnée aux bâtonnets de poisson pané, ralentie la croissance des germes mésophiles et les germes psychrotrophes, comparativement au contrôle pendant la période de conservation. PPE a également montré une activité antimicrobienne lorsqu'il a été incorporé au jus de pomme, de carottes et au vin désalcoolisé (**Altunkaya et al., 2013 ; Trigo et al., 2020 ; Tárrega et al., 2014**). D'après la littérature scientifique, les tannins jouent le rôle d'agent antimicrobien, par une inhibition de l'activité enzymatique, une immobilisation des substrats tel que les minéraux, les vitamines et les éléments organiques, en les rendant non disponibles aux microorganismes. Ainsi, l'absorption des phénols par la cellule provoque une rupture de la paroi et par conséquent une perturbation des fonctions et des échanges membranaires (**Akhtar et al., 2015 ; Ismail et al., 2012**).

CONCLUSION

Conclusion

Dans la présente étude, le pouvoir conservateur (antioxydant et antimicrobien) de l'extrait des écorces de grenades (PPE) a été évalué *in vitro* (sur le radical DPPH et des souches bactériennes et fongiques) et *in vivo* (sur un jus d'orange frais n'ayant pas subi de traitement préalable), afin de tester son efficacité comme succédané des conservateurs chimiques de synthèse. Les résultats des essais *in vitro* ont révélé un haut pouvoir antioxydant et antimicrobien, avec un IC_{50} de 6,22 $\mu\text{g/ml}$ et des zones d'inhibitions variables suivant la souche bactérienne ou fongique considérée. De mêmes, les essais *in vivo* ont montré des effets très hautement significatifs entre les paramètres physico-chimiques et microbiologiques du jus d'orange et la dose de PPE. En effet, l'addition de PPE au jus d'orange frais est sans effet sur le pH, le TSS ($^{\circ}\text{Brix}$) et le trouble du jus, alors qu'il a influé positivement et significativement ($p < 0,05$) l'indice de brunissement et l'acidité titrable, par une réduction des réactions de brunissement et de l'acidité comparés à ceux des contrôles. Un effet sur la charge microbienne a été également observé avec une prolongation de la durée de vie du jus frais de 2 jours comparativement aux contrôles. Par conséquent, on peut conclure que les écorces des grenades peuvent être réutilisées dans la conservation des produits frais et constituent un moyen durable pour réduire les effets néfastes liés à l'utilisation des produits de synthèse, pour une alimentation biologique saine et durable.

RÉFÉRENCES

Références bibliographiques :

Aghajanzadeh, S.; Ziaifar, A. M.; Kashaninejad, M.; Maghsoudlou, Y.; & Esmailzadeh, E. Thermal inactivation kinetic of pectin methylesterase and cloud stability in sour orange juice. *Journal of Food Engineering*, 2016, 185, 72–77.

Akhtar, S.; Ismail, T.; Fraternali, D.; Sestili, P. Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features, *Food Chem.*, 2015, 174, 417–425.

Ali, A., Chen, Y., Liu, H., Yu, L., Baloch, Z., Khalid, S.; Zhu, J.; Chen, L. Starch-based antimicrobial films functionalized by pomegranate peel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 129, 1120–1126.

Altunkaya, A.; Hedegaard, R. V.; Harholt, J.; Brimer, L.; Gokmen, V.; Skibsted, L. H. Palatability and chemical safety of apple juice fortified with pomegranate peel extract. *Food Funct.*, 2013, 4, 1468–1473.

Al-Zoreky, N. S. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 134 (3), 244-248.

Berizi, E.; Shekarforoush, S. S.; Hosseinzadeh, S. Effects of Methanolic Pomegranate Peel Extract on the Chemical, Sensory, Textural, and Microbiological Properties of Guttred Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) during Frozen Storage, *J. Food Prot.*, 2016, 79, 1700–1706.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 1995, 28, 25-30.

Cedola, A.; Cardinali, A.; Del Nobile, M.A.; Conte, A. Fish burger enriched by olive oil industrial by-product. *Food Sci. Nutr.* 2017, 5, 837–844.

Cortes, C.; Esteve, M. J.; Frigola, A. Color of orange juice treated by high intensity pulsed electric fields during refrigerated storage and comparison with pasteurized juice. *Food Contam.*, 2008, 19, 151–158.

Dahham, S. S.; Ali, M. N.; Tabassum, H.; Khan, M. Studies on Antibacterial and Antifungal Activity of Pomegranate (*Punica granatum L.*). *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 2010, 9 (3): 273-281.

Dorris, M. R.; Voss, D. M.; Bollom, M. A.; Krawiec-Thayer, M. P.; & Bolling, B. W. Browning Index of Anthocyanin-Rich Fruit Juice Depends on pH and Anthocyanin Loss More Than the Gain of Soluble Polymeric Pigments. *Journal of Food Science*, 2018, 83(4), 911–921.

El-Hadary, A.E.; Taha, M. Pomegranate peel methanolic-extract improves the shelf-life of edible-oils under accelerated oxidation conditions. *Food science & Nutrition*, 2020, 8, 1798-1811.

Gögüs, F., Düzdemir, C., & Eren, S. Effects of some hydrocolloids and water activity on nonenzymic browning of concentrated orange juice. *Nahrung/Food*, 2000, 44(6), 438–442.

Hassoun, A.; Carpena, M.; Prieto, M.A.; Simal-Gandara, J.; Ozugul F.; Ozogul, Y.; Çoban, O.E.; Gudjónsdóttir, M.; Barba, F.J.; Martí-Quijal, F.; Jambrak, A.R.; Maltar-Strmečki, N.; Kljusurić, J.G.; Regenstein, J.M. Use of Spectroscopic Techniques to Monitor Changes in Food Quality during Application of Natural Preservatives: A Review. *Antioxidants*, 2020,9(9), 882-1012.

Iftikhar, T.; Wagner, M. E.; Rizvi, S. S. Enhanced Inactivation of Pectin Methyl Esterase in Orange Juice Using Modified Supercritical Carbon Dioxide Treatment. *International Journal of Food Science & Technology*, 2014, 49(3), 804–810.

Ismail, T.; Akhtar, S.; Sestili, P.; Riaz, M.; Ismail, A.; Labbe, R. G. Antioxidant, antimicrobial and urease inhibitory activities of phenolics-rich pomegranate peel hydro-alcoholic extracts, *Journal of Food Biochemistry*, 2016, 40 (4), 550–558.

Ismail, T.; Sestili P.; Akhtar, S. Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects, *J. Ethnopharmacol.*, 2012, 143, 397–405.

Johnson, J.R.; Braddock R.J.; Chen, C.S. Kinetics of ascorbic acid loss and nonenzymatic browning in orange juice serum: experimental rate constants. *J. Food Sci.* 1995, 60, 502-505.

Kanatt, S.R.; Chander, R.; Sharma, A. Antioxidant and antimicrobial activity of pomegranate peel extract improves the shelf life of chicken products. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2010, 45, 216–222.

Kandyliis, P.; Kokkinomagoulos, E. Review: Food applications and potential health benefits of pomegranate and its derivatives. *Foods*, 2020, 9, 122.

Kaneria, M.J.; Chanda, S.V. The effect of sequential fractionation techniques on the various efficacies of pomegranate “*Punica granatum L.*” *Food Anal. Methods*.2013, 6, 164-175.

Kanoun, K.; Abbouni, B.; Gabbés, S.; Dellani, S. ; Zizi ,N. In-vitro Antibacterial Activity of Algerian Pomegranate (*Punica granatum linn*) peels on Some Antibiotic Resistant Gram-Negative and Positive Bacterial Strains. *Middle East J. Sci. Res.*, 2014, 21 (9), 1579- 1589.

Konsoula, Z. Comparative efficacy of pomegranate juice, peel and seed extract in the stabilization of corn oil under accelerated conditions. *International Journal of Nutrition and Food Engineering*, 2016, 10(9), 556-563.

Li, Y.; Guo, C.; Yang, J.; Wei, J.; Xu, Y.; Cheng, S. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chem.* 2006, 96, 254–260.

Mahale, D.P.; Khade, R.G.; Vaidya, V.K. Microbiological analysis of street vended fruit juices from Mumbai city, India. *Internet J. Food Saf.*, 2008, 10(9), 31–34.

Maherani, B.; Khlifi, M.A.; Salmieri, S.; Lacroix, M. Design of biosystems to provide healthy and safe food—part B: effect on microbial flora and sensory quality of orange juice. *European Food Research and Technol.*, 2019, 245, 581-591.

Martinez-Morales, F., Alonso-Castro, A. J., Zapata-Morales, J. R., Carranza-Álvarez, C., & Aragon-Martinez, O. H. Use of standardized units for a correct interpretation of IC50 values obtained from the inhibition of the DPPH radical by natural antioxidants. *Chemical Papers*. 2020, 74, 3325–3334.

Martins, C. P. C.; Cavalcanti, R. N.; Cardozo, T. S. F.; Couto, S. M.; Guimarães, J. T.; Balthazar, C. F., ... Cruz, A. G. Effects of microwave heating on the chemical composition and bioactivity of orange juice-milk beverages. *Food Chemistry*, 2021, 345, 128746.

Masci, A. ; Coccia, A. ; Lendaro, E. ; Mosca, L. ; Paolicelli, P. ; Cesa, S. Evaluation of different extraction methods from pomegranate whole fruit or peels and the antioxidant and antiproliferative activity of the polyphenolic fraction. *Food chemistry*, 2016, 202, 59-69.

Melgarejo, P.; Nunez-Gomez, D.; Legua, P.; Martinez-Nicolas, J.J.; Almansa M.S. Pomegranate (*Punica granatum* L.) a dry pericarp fruit with fleshy seeds. *Trends in food science & technology*, 2020, 102, 232-236.

Moghadam, M.; Salami, M.; Mohammadian, M.; Khodadadi, M.; Emam-Djomeh, Z. Development of antioxidant edible films based on mung bean protein enriched with pomegranate peel. *Food Hydrocolloids*, 2020, 104, 105735-105742.

Oliveira, A.; Gomes, M. H.; Alexandre, E. M. C.; Almeida, D. P. F.; Pintado, M. Impact of pH on the phytochemical profile of pasteurized peach purée during storage, *J. Agric. Food Chem.*, 2014, 62, 12075–12081.

Oliveira, I.; Sousa, A.; Morais, J. S.; Ferreira, I. C. F. R.; Bento, A.; Estevinho, L.; & Pereira, J. A. Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of three hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46(5), 1801–1807.

Panza, O.; Conte, A.; Del Nobile, L.A. Pomegranate By-Products as Natural Preservative to Prolong the Shelf Life of Breaded Cod Stick. *Molecules*, 2021, 26(8), 2385-2398.

Rao, P.; Rathod, V. Valorization of food and agricultural waste: A step towards greener future. *Chem. Rec.*, 2019, 19, 1858–1871.

Salgado, J.M.; Ferreira, T.R.B; Biazotto, F.O.B.; Tadeu dos Santos Dias C. Increased Antioxidant Content in Juice Enriched with Dried Extract of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel. *Plant foods for human nutrition*, 2012, 67, 39-43.

Sandhya, S.; Khamrui, K.; Prasad, W.; & Kumar, M. C. T. Preparation of pomegranate peel extract powder and evaluation of its effect on functional properties and shelf life of curd. *LWT*, 2018, 92, 416–421.

Sébastien B. Les acides dans les boissons. Aspects qualitatifs et quantitatifs. Agrégation de physique. Université Blaise pascal, 2003, 21, 17-18.

Singh, B.; Singh, J. P.; Kaur, A.; Singh, N. Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum* L.) peel: a review. *Food Chemistry*, 2018, 261, 75–86.

Tárrega, M. A.; Varela, P.; Fromentin, E.; Feuillère, N.; Issaly, N.; Roller, M.; Sanz-Buenhombre, M.; Villanueva, S.; Moro, C.; Guadarrama, A. et al. Specific phenolic compounds and sensory properties of a new dealcoholized red wine with pomegranate (*Punica granatum* L.) extract. *Food Sci. Technol. Int.*, 2014, 20, 421–429.

Tehranifar, A.; Selahvarzi, Y.; Kharrazi, M.; Bakhsh, V. J. High potential of agro-industrial by-products of pomegranate (*Punica granatum* L.) as the powerful antifungal and antioxidant substances, *Industrial Crops And Products*, 2011, 34 (3), 1523–1527.

Thorat, I.D.; Jagtap, D.D.; Mohapatra, D.; Josh, D. C.; Sutar, R. F.; Kapdi, S. S. Antioxidants, their properties, uses in food products and their legal implications. *International Journal of Food Studie*, 2013, 2, 81-104.

Tiwari B. K.; Muthukumarappan K.; O'donnell C. P.; Cullen P. J. Effects of Sonication on the Kinetics of Orange Juice, Quality Parameters *Journal of Agricultural and Food Chemistry. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, 2423–2428.

Trigo, J.P. ; Alexandre, E.M.C. ; Silva, S.; Costa, E.; Saraiva, J.A.; Pintado M. Study of viability of high pressure extract from pomegranate peel to improve carrot juice characteristics. *Food & Fonction*, 2020, 11, 3410-3419.

Venkataramanamma, D; Aruna, P.; Singh, R. P. Standardization of the conditions for extraction of polyphenols from pomegranate peel. *J. Food Sci. Technol.*, 2016, 35(5), 2497-2503.

Viuda-Martos, M. ; Pérez-Álvarez, J. A. ; Sendra, E.; Fernández-López, J. *In vitro* antioxidant properties of pomegranate (*punica granatum*) peel powder extract obtained as coproduct in the juice extraction process, *Journal of Food Processing and Preservation*, 2013, 37(5), 772-776.

Zaki, S. A.; Abdelatif, S. H.; Abdelmohsen, N. R.; & Ismail, F. A. Phenolic compounds and antioxidant activities of pomegranate peels. *International Journal of Food Engineering*, 2015, 1(2), 73-76.