

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE VETERINAIRE D'ALGER

THESE

Pour l'obtention du diplôme de Doctorat Es Sciences

Filière : Sciences Vétérinaires

Option : Hygiène et Sécurité Alimentaires

THEME

**Etude sur l'effet combiné de l'emballage sous vide et des extraits de
plantes sur la durée de conservation et la qualité des filets de sardine
(*Sardina pilchardus*) réfrigérés**

Présentée par : **HOUICHER Abderrahmane**

Directeur de thèse : **Pr BENDEDDOUCHE Badis**

Devant les membres du jury :

Présidente : Pr/ BENMAHDI. M-H

Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger

Examineur : Pr/ HAMDI. T-M

Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger

Examineur : Pr/ YOUSFI. M

Université Amar Telidji-Laghouat

Examineur : Dr/ ZOUAKH. D-E

EPSNV-Alger

Année : 2013/2014

" Etude sur l'effet combiné de l'emballage sous vide et des extraits de plantes sur la durée de conservation et la qualité des filets de sardine (*Sardina pilchardus*) réfrigérés"

Résumé

Mentha spicata et *Artemisia campestris* sont des sources riches en composés phénoliques et leurs extraits montrent d'excellentes activités antioxydantes et antimicrobiennes. Pour cela, des extraits éthanoliques de menthe et d'artémisia ont été appliqués dans les filets de sardine (*Sardina pilchardus*) crue en combinaison avec l'emballage sous vide (VP) afin d'étudier ses effets sur les changements organoleptiques, chimiques et bactériologiques durant 21 jours de conservation à $3 \pm 1^\circ\text{C}$. Dans la présente étude, trois différents groupes ont été testés: un premier groupe "témoin" sans l'addition d'extrait de plante (VC); un deuxième groupe traité par 1% d'extrait de menthe (VM) et un troisième groupe traité par 1% d'extrait d'artémisia (VA). L'appréciation organoleptique a permis de déterminer une durée de vie de 10 jours pour le groupe témoin (VC) et de 17 jours pour les groupes VM et VA. Le suivi de l'oxydation des lipides, contrôlé par le SR-TBA, montre que l'addition de 1% d'extrait de *Mentha spicata* a réduit efficacement les valeurs SR-TBA dans la chair de poisson. Les valeurs d'ABVT sont maintenues en dessous des limites d'acceptabilité fixées par l'EEC pour les échantillons de sardine traités par 1% d'extrait d'artémisia (VA) jusqu'au temps de rejet organoleptique. De plus, le traitement combiné d'extraits naturels avec l'emballage sous vide entraîne une nette réduction de l'accumulation de l'histamine et de la tyramine dans la chair de sardine tandis que l'addition de 1% de chaque extrait n'a pas d'effet inhibiteur sur la production d'ammoniac, de putrescine, et de dopamine. Le contrôle bactériologique a permis également de mettre en évidence l'existence d'un retard de croissance des germes aérobies totaux, des coliformes totaux et des bactéries formant histamine dans le groupe traité par 1% d'extrait d'artémisia (VA). Par contre, aucune réduction significative n'a été observée dans les charges des bactéries lactiques pour les groupes traités. Sur la base de ces résultats, il peut être suggéré l'application d'extraits de menthe et d'artémisia dans l'industrie du poisson comme des conservateurs naturels en augmentant leur durée de vie sans altérer les propriétés sensorielles.

Mots clés : Sardine ; *Mentha spicata* ; *Artemisia campestris* ; Conservation ; Qualité ; Amine biogène ; Emballage sous vide

"Study of the combined effect of vacuum packaging and plant extracts on shelf life and quality of refrigerated sardine (*Sardina pilchardus*) fillets"

Abstract

Mentha spicata and *Artemisia campestris* are rich sources of polyphenolic compounds and their extracts exhibit excellent antioxidant and antimicrobial activities. Therefore, ethanolic extracts from mint and artemisia were applied in vacuum packaged (VP) sardine (*Sardina pilchardus*) fillets in order to investigate their effects on sensory, chemical and bacteriological changes during 21 days at $3\pm 1^{\circ}\text{C}$. In the present study, three different groups were tested: VC, control group; VM, group treated with 1% mint extract; and VA, group treated with 1% artemisia extract. The observed shelf-life of sardine fillets was 10 days for control samples, whereas the combination of VP with mint and artemisia extracts extended the product's shelf-life to 17 days. Addition of 1% *Mentha spicata* extract effectively reduced the lipid oxidation, monitored as thiobarbituric acid-reactive substances (TBARs) values, in fish muscle. Total volatile base nitrogen (TVB-N) was maintained at low levels, therefore below the critical limits set by the European Union, in VA samples until the rejection time. In addition, natural extract treatments combined with VP resulted in significant reductions of histamine and tyramine formation in fish muscle, although the application of 1% of each extract in vacuum-packed sardine had no effect on ammonia, putrescine and dopamine accumulation. Results of bacteriological assessment showed the existence of a reduced growth of aerobic plate count, coliform count and histamine forming bacteria count in VA group, while lactic acid bacteria did not show a significant difference among groups. Our findings suggested the application of mint and artemisia extracts in fish industry as natural preservatives since they increase product's shelf-life without adversely affecting the sensory characteristics of fish.

Keywords: Sardine ; *Mentha spicata* ; *Artemisia campestris* ; Shelf-life ; Quality ; Biogenic amine ; Vacuum pack

"دراسة حول التأثير المشترك بين التعبئة بتفريغ الهواء و المستخلصات النباتية على نوعية و مدة حفظ شرائح السردين
(*Sardina pilchardus*) المبردة"

ملخص:

يعتبر النعناع الاخضر *Mentha spicata* و الشيح الحقلي *Artemisia campestris* مصدرين غنيين بالمركبات الفينولية و اظهرت مستخلصاتهما نشاطات ممتازة ضد الاكسدة و الميكروبات، لهذا تم اضافة مستخلصاتهما الاثنولوية الى شرائح السردين (*Sardina pilchardus*) مع استعمال التعبئة بتفريغ الهواء لدراسة تأثيرهما على التغيرات الحسية، الكيمائية و البكتيريولوجية خلال حفظ السردين في درجة حرارة $3\pm 1^\circ\text{C}$ لمدة 21 يوما. تم اختيار ثلاث مجموعات لهذه الدراسة حيث المجموعة الاولى (الشاهد؛ VC) لم يضاف اليها مستخلصات نباتية، المجموعة الثانية (VM) مضاف اليها مستخلص النعناع 1% و المجموعة الثالثة (VA) مضاف اليها مستخلص الشيح الحقلي 1%. اظهر التحليل الحسي ان مدة الحفظ تقدر بـ 10 ايام لعينات الشاهد و 17 يوما للعينات المعالجة بالمستخلصات النباتية. بينت مراقبة اكسدة الدهون بمؤشر SR-TBA ان اضافة مستخلص النعناع 1% تخفض بشكل فعال تشكل SR-TBA في شرائح السردين، اما مستخلص الشيح الحقلي فقد حافظ على مستويات ABVT الى غاية زمن الالغاء الحسي دون الحدود الحرجة التي وضعها الاتحاد الاوروبي. بالإضافة الى ذلك سمح العلاج المشترك بين المستخلصات النباتية و التعبئة بتفريغ الهواء بتخفيض هام في تجمع الهيستامين و التيرامين في شرائح السمك، لكن اضافة 1% من كل مستخلص لم تؤثر على تعطيل تشكل الامونيا، البترسين و الدوبامين. سمحت المراقبة البكتيرية من اظهار تأخر ملحوظ في نمو البكتيريا الهوائية الكلية، البكتيريا القولونية و البكتيريا المنتجة للهيستامين في شرائح السردين المعالجة بمستخلص الشيح الحقلي 1% لكن لم يلاحظ أي انخفاض مميز في نمو بكتيريا حمض اللبنيك بين المجموعات الثلاثة. بناء على هذه النتائج، فإنه يمكن اقتراح تطبيق مستخلصات النعناع الاخضر و الشيح الحقلي في صناعة الأسماك كمادة حافظة طبيعية لزيادة مدة حفظها دون تغيير خصائصها الحسية.

الكلمات المفتاحية: سردين ؛ *Mentha spicata* ؛ *Artemisia campestris* ؛ حفظ ؛ جودة ؛ أمين حيوي ؛ تعبئة بتفريغ الهواء

DEDICACE

Je dédie ce travail...

Avec une attention particulière à mes parents pour les valeurs que vous m'avez transmises avec tant de patience et d'attention, pour avoir toujours soutenu mes choix et m'avoir permis de construire librement mon avenir. De tout cœur merci.

A ma femme, pour son attachement, ses chaleureux encouragements, sa vive compassion à ma réussite et surtout pour sa compréhension et sa patience.

A mes adorables enfants, Mohamed, Meriem Hadel, Moncef et Anas à qui je souhaite pleins de succès.

A mes Frères,

A mes Sœurs,

A mes Beaux Parents,

A mes Amis,

A tous les Miens.

Enfin, à tous ceux qui de près ou de loin, ont collaboré à la réalisation de ce travail, en guise de reconnaissance.

REMERCIEMENTS

J'adresse mes très sincères remerciements à M^r Bendeddouche Badis, Professeur en hygiène et sécurité alimentaire, pour avoir dirigé cette thèse, pour ses conseils et ses remarques percutantes et plus particulièrement pour sa disponibilité et son savoir qui m'ont permis d'avancer dans mon travail.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Je remercie particulièrement M^{lle} Benmahdi M.H, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire El Harrach, pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Je remercie également le Professeur Hamdi T.M, le Professeur Yousfi M et le Docteur Zouakh D.E, qui ont bien voulu examiner ce travail.

Je tiens à remercier plus particulièrement Monsieur le Professeur Özogul F pour l'accueil au sein de son laboratoire, la confiance qu'il m'a accordée pour la réalisation de cette étude et surtout de son encadrement de qualité.

J'adresse mes sincères remerciements à M^{me} Kuley E, chargée de recherche à la Faculté des Pêches, Université de Cukurova – Turquie, pour sa contribution à ce travail au cours de mon stage. Merci Esmeray pour ton aide, ta gentillesse, ton soutien et ton précieux coup de main lors de la réalisation pratique de cette étude.

Je souhaite aussi remercier le Professeur Özogul Y pour ses conseils précieux lors de la réalisation de ce travail. Je remercie également l'équipe de laboratoire de technologie de transformation du poisson, Faculté des Pêches, Université de Cukurova – Turquie, avec à leur tête Esra, Bourhan, Yilmaz, Mustafa, Selma, Saadet, Hatice, et Mehmet autant pour leur aide que pour leur accueil.

Je souhaite remercier tout particulièrement le D^r Bensid A pour sa disponibilité et son aide mais surtout pour son amitié durant mes années d'étude.

J'adresse mes sincères remerciements à M^r Benahmed Karim, Enseignant d'anglais, pour son aide et sa contribution dans la correction finale des articles.

Table des matières**Résumé****Liste des abréviations****Liste des tableaux****Liste des figures****INTRODUCTION** 1**PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

1.	Généralités	4
1.1.	<i>Sardina pilchardus</i> « Sardine d'Europe »	4
1.2.	Composition chimique du poisson	5
1.3.	Microbiologie du poisson	7
1.3.1.	Microflore naturelle (ou indigène)	7
1.3.2.	Microflore de contamination (ou non indigène)	8
1.4.	Modifications post –mortum du poisson	9
1.4.1.	Changements sensoriels	9
1.4.2.	Altérations autolytiques	10
1.4.3.	Changements bactériologiques	17
2.	Amines biogènes	19
2.1.	Toxicité des amines biogènes dans le poisson	20
2.2.	Facteurs influant sur la formation d'amines biogènes dans le poisson	22
2.2.1.	Matières premières	23
2.2.2.	Microorganismes	24
2.2.3.	Traitement et conditions d'entreposage des produits de la pêche	26
2.3.	Amines biogènes comme indice de qualité des produits de la pêche	32

2.4.	Limites légales d'amines biogènes dans les produits de la pêche	34
2.4.1.	Limites critiques pour les concentrations d'histamine dans les produits de la pêche	34
2.4.2.	Température de stockage	35
2.5.	Détermination des amines biogènes dans le poisson	36
2.5.1.	Processus d'extraction	37
2.5.2.	Processus de détermination	37
3.	Conservateurs naturels d'origine végétale	42
3.1.	Antioxydants naturels pour des utilisations alimentaires	42
3.1.1.	Huiles végétales	43
3.1.2.	Céréales	45
3.1.3.	Extraits de plantes	45
3.1.4.	Mécanismes d'action des antioxydants naturels	47
3.2.	Antimicrobiens naturels pour des utilisations alimentaires	49
3.2.1.	Huiles essentielles	49
3.2.2.	Extraits de plantes	51
3.2.3.	Mécanismes d'action des antimicrobiens naturels	52
3.3.	Stabilité des composés phytochimiques pendant la transformation alimentaire	54
3.4.	Évaluation de la toxicité d'extraits de plantes	55
PARTIE EXPERIMENTALE		
1.	Objectifs	57
2.	Matériels et méthodes	60
2.1.	Matériel végétal	60

2.1.1	Préparation des extraits de plantes	61
2.1.2.	Détermination des composés phénoliques totaux	62
2.2.	Préparation des échantillons de poissons	63
2.3.	Composition chimique	64
2.3.1.	Teneur en lipides	64
2.3.2.	Dosage de l'humidité	65
2.3.3.	Protéines brutes totales	66
2.3.4.	Cendres brutes	66
2.4.	Appréciation organoleptique	67
2.4.1.	Appréciation organoleptique des filets de poisson cru	67
2.4.2.	Appréciation organoleptique des filets de poisson cuit	68
2.5.	Analyses physico-chimiques	70
2.5.1.	pH	70
2.5.2.	Dosage de l'Azote basique volatil total (ABVT)	70
2.5.3.	Dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (SR-TBA)	70
2.5.4.	Indice de peroxyde (PV)	71
2.5.5.	Analyse des acides gras libres (AGL)	72
2.5.6.	Analyse des amines biogènes	72
2.5.6.1.	Préparation des solutions d'amine standard	72
2.5.6.2.	Préparation des échantillons pour l'analyse des amines biogènes	73
2.5.6.3.	Procédure de dérivation	73

2.5.6.4. Conditions chromatographiques	74
2.6. Analyses bactériologiques	75
2.6.1. Germes aérobies totaux (APC)	75
2.6.2. Coliformes totaux (CC)	75
2.6.3. Bactéries lactiques (LAB)	75
2.6.4. Bactéries formant histamine (HFB)	76
2.7. Analyses statistiques	76
3. Résultats et discussion	77
3.1. Composés phénoliques totaux	77
3.2. Composition chimique	78
3.3. Appréciation organoleptique	79
3.4. Analyses physico-chimiques	82
3.5. Analyses bactériologiques	95
CONCLUSION GENERALE	102
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	104
ANNEXES	137

LISTE DES ABREVIATIONS

AAL: Acides aminés libres

ABVT: Azote basique volatil total

AGL: Acides gras libres

ANP: Azote non protéique

AOAC: Association of official analytical chemists

APC: Aerobic plate count

CC: Colifom count

DAO: Diaminoxidase

DJA: Dose journalière acceptable

DSENO: Dose sans effet nocif observé

EAG: Equivalent d'acide gallique

FDA: Food and drug administration

FIA: Flow injection analysis

GRAS: Generally recognized as safe

HEs: Huiles essentielles

HFB: Histamine forming bacteria

LAB: Lactic acid bacteria

MAO: Monoamine oxydase

MAP: Modified atmosphere packaging

MPa: Mégapascal

MDA: Malonaldéhyde

mEq: milliequivalents

OPA: *o*- phtalaldéhyde

OTMA: oxyde de triméthylamine

PAO: Polyamine oxydase

PCA: Plate count agar

PV: Peroxide value

SR-TBA: Substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique

SSO: Specific spoilage organism

TBA: Acide Thiobarbiturique

TCA: Acide trichloroacétique

VP: Vacuum packaging

LISTE DES TABLEAUX

Tableau n° 1 :	Principaux composants (%) des muscles de poisson (Stansby, 1962 ; Love, 1970).	5
Tableau n° 2 :	Les bactéries pathogènes non indigènes des produits de la pêche (Huss, 1995).	9
Tableau n° 3 :	Barème de la méthode d'indice de qualité pour les filets de morue fraîche (<i>Gadus morhua</i>) modifié (Bonilla et al., 2007).	68
Tableau n° 4 :	Echelle hédonique utilisée pour l'évaluation organoleptique de la sardine cuite au four (Paulus et al., 1979).	69
Tableau n° 5 :	Le rendement et la teneur en phénols totaux des extraits éthanoliques d' <i>Artemisia campestris</i> et de <i>Mentha spicata</i> L.	77
Tableau n° 6 :	La composition chimique de la sardine fraîche.	78
Tableau n° 7 :	Changements de pH, ABVT (mg/100 g), SR-TBA (mg malonaldéhyde /kg), PV (mEq/kg) et AGL (% d'acide oléique) dans les filets de sardine durant le stockage à 3±1 °C.	83
Tableau n° 8 :	Changements d'ammoniac et d'amines biogènes dans les filets de sardine durant le stockage à 3±1 °C.	91
Tableau n° 9 :	Evolution des germes aérobies totaux (APC), des coliformes totaux (CC), des bactéries lactiques (LAB) et des bactéries formant histamine (HFB) dans les filets de sardine durant le stockage à 3±1 °C.	99

LISTE DES FIGURES

Figure n° 1 :	<i>Sardina pilchardus</i> «Sardine d'Europe» (Quéro, 1997).	4
Figure n° 2 :	Auto-oxydation des lipides polyinsaturés (Huss, 1999).	11
Figure n° 3 :	Mécanisme d'initiation de la peroxydation des lipides par l'activité lipoxigénasique (German et al., 1985).	12
Figure n° 4 :	Les voies métaboliques de la formation des amines biogènes dans le poisson (Adapté par Halász et al., 1994).	20
Figure n° 5 :	Logigramme des étapes du protocole expérimental.	59
Figure n° 6 :	Menthe verte (<i>Mentha spicata</i> L.)	60
Figure n° 7 :	<i>Artemisia campestris</i> (dgouft)	61
Figure n° 8 :	Unité d'hydrodistillation de type Clavenger.	62
Figure n° 9 :	Les étapes de préparation des échantillons de sardine.	64
Figure n° 10 :	Chromatographe en phase liquide à haute performance (HPLC) (Shimadzu-Proeminence, Kyoto, Japon).	74
Figure n° 11 :	Les changements dans la qualité organoleptique (points de défauts) des filets de sardine crue durant le stockage à 3±1 °C.	80
Figure n° 12 :	Les changements sensoriels (score) des filets de sardine cuite durant le stockage à 3±1 °C.	81
Figure n° 13 :	Evolution des germes aérobies totaux (APC) au cours de l'entreposage des filets de sardine à 3±1 °C.	96
Figure n° 14 :	Evolution des coliformes totaux (CC) au cours de l'entreposage des filets de sardine à 3±1 °C.	97
Figure n° 15 :	Evolution des bactéries lactiques (LAB) au cours de l'entreposage des filets de sardine à 3±1 °C.	98
Figure n° 16 :	Evolution des bactéries formant histamine (HFB) au cours de l'entreposage des filets de sardine à 3±1 °C.	100

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les petits pélagiques représentent environ 50% du total des captures en Méditerranée (Lleonart, 2005). La sardine (*Sardina pilchardus*) est commercialement une espèce de poisson importante dans de nombreux pays méditerranéens. En Algérie, les captures des petits pélagiques constituent les apports les plus importants avec une production annuelle d'environ 130.000 tonnes constituée à 80% de petits pélagiques (sardine, anchois) (MPRH, 2003). Au cours du stockage, les acides gras hautement insaturés communément trouvés dans la sardine sont facilement sensibles à l'oxydation qui se traduit par une odeur et un goût de rance ainsi que des modifications dans la texture, la couleur et la valeur nutritionnelle (Olafsdottir et al., 1997). Durant certaines périodes de l'année une part importante de la sardine pêchée est inexploitée en raison de l'insuffisance des moyens de conservation et de transformation. Afin de contribuer à une meilleure utilisation de cette espèce, la préparation de différents types de produits a été essayée, comme les filets et les produits fumés ainsi que les hachis et le surimi (Mendes et al., 2008).

L'emballage sous vide (VP) et le conditionnement sous atmosphère modifiée (MAP), combinés avec la réfrigération, sont devenus de plus en plus les techniques de conservation les plus utilisées, qui ont apporté des changements majeurs dans le stockage, la distribution et la commercialisation de produits crus et transformés pour répondre aux demandes des consommateurs (Özogul et al., 2004). Les techniques VP et MAP sont largement adaptées pour exclure l'oxygène de l'espace libre. Cependant, ces méthodes physiques n'excluent pas toujours l'oxygène en totalité. Il reste généralement entre 0.1 à 2% d'oxygène dans l'emballage et encore plus quand la nourriture est poreuse. En outre, l'oxygène qui pénètre à travers le film d'emballage au cours du stockage ne peut pas être ôté par ces techniques (Vermeiren et al., 2003). Ces moyens ne sont pas toujours pratiques, car très peu d'oxygène est nécessaire pour initier et maintenir le processus d'oxydation. Par conséquent, il est assez fréquent de combiner ces méthodes avec l'utilisation d'antioxydants.

En effet, la consommation d'aliments contenant de fortes concentrations d'amines biogènes est associée à des effets toxiques et constitue un danger potentiel pour la santé humaine. Les composés principalement impliqués dans ces effets toxiques sont l'histamine et la tyramine. L'histamine est l'amine biogène la plus importante dans les poissons et ses produits de transformation (Ruiz-Capillas et Jiménez-Colmenero, 2009). Cependant,

l'histamine ne semble pas être le seul agent causal des accidents scombrotiques (Lehane et Olley, 2000 ; Taylor, 1986). D'autres amines telles que la putrescine et la cadaverine sont également impliquées dans cette maladie car elles renforcent la toxicité de l'histamine (Halász et al., 1994 ; Rice et al., 1976). De plus, la formation d'amines biogènes dans les produits de la pêche est causée principalement par décarboxylation enzymatique microbienne de certains acides aminés libres. En général, le stockage à basse température n'affecte pas l'activité enzymatique ou la croissance microbienne et donc n'affecte pas la production des amines biogènes. L'entreposage des produits de la pêche entre 2 et 5 °C élimine la production d'histamine par les bactéries mésophiles. Cependant, les bactéries psychrotolérantes peuvent produire des concentrations toxiques d'histamine dans ces produits à ces températures (Mendes, 2009). De plus, l'emballage sous vide (VP) et le conditionnement sous atmosphère modifiée (MAP) n'ont pas d'effet inhibiteur important sur la formation d'histamine dans les produits de la pêche frais (Dalgaard et al., 2008). Emborg et al. (2005) ont montré que les bactéries psychrotolérantes, comme *Morganella morganii* et *Photobacterium phosphoreum*, caractérisées par la croissance à 0-2 °C, sont capables de former des concentrations toxiques d'histamine dans les steaks de thon emballés sous vide à 2 °C.

Le défi pour les scientifiques de l'alimentation est de développer de nouvelles techniques de conservation qui permettront d'améliorer la qualité et prolonger la durée de conservation des denrées alimentaires sans compromettre la sécurité ou les propriétés sensorielles (Roller, 2003). Par conséquent, l'utilisation dans le futur des substances aromatiques d'origine végétale comme des bioconservateurs dans les aliments se fera en combinaison avec d'autres méthodes de conservation (Molins, 2001 ; Patterson, 1990). De nombreux conservateurs sont ajoutés aux aliments comme des agents antioxydants ou antimicrobiens. Les composés phénoliques sont connus de posséder ces deux propriétés. Plusieurs études ont été menées afin d'identifier les composés phénoliques naturels qui possèdent des propriétés antioxydantes ou des activités antimicrobiennes contre des organismes pathogènes ou d'altération dans les milieux de laboratoire. Cependant, peu d'entre eux sont traduits en applications réelles dans les produits alimentaires (Roller, 2003).

Mentha spicata L., est une plante aromatique de la famille des *Lamiaceae*, communément connue sous le nom de menthe verte ou menthe de jardin (Ali et al., 2002). Cette famille est une source riche en composés polyphénoliques possédant de fortes propriétés

antioxydantes. L'extrait de menthe a des bonnes teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes et présente une excellente activité antioxydante (Kanatt et al., 2007). Beaucoup de composés phénoliques, de flavonoïdes et de terpénoïdes sont identifiés à partir de différents extraits de menthe verte. En outre, *Artemisia campestris* est une plante vivace herbacée légèrement aromatique appartenant à la famille des *Asteraceae*, très répandue dans le sud Algérien, communément appelée "dgouft". Karabegovic et al. (2011) ont démontré que les huiles essentielles et les extraits de plusieurs *Artemisia* sp. possèdent de fortes activités antimicrobiennes. Les extraits hydro-éthanoliques et d'infusion d'*A. campestris* montrent une forte activité antioxydante et des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes très élevées (Akrouf et al., 2011). De nombreuses études ont évalué l'activité antioxydante et antimicrobienne de plusieurs extraits de plantes ou d'huiles essentielles sur les poissons. Cependant, des travaux limités existent concernant les propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de *Mentha spicata* L. et d'*Artemisia campestris*, mais leurs applications dans le poisson n'ont pas encore été pleinement étudiées, raison principale du but de notre étude qui propose d'évaluer les effets des extraits de menthe et d'*Artemisia* sur les changements organoleptiques, chimiques et bactériologiques des filets de sardine crue emballés sous vide (VP) pendant 21 jours de conservation à $3 \pm 1^\circ\text{C}$.

Après une étude bibliographique reprenant les principales données actualisées en la matière, l'effet combiné de l'emballage sous vide (VP) avec les extraits de *Mentha spicata* L. et d'*Artemisia campestris* a été étudié dans un premier temps afin de déterminer la durée maximale de conservation des filets de sardine. Cette partie a également pour objectif d'évaluer le pouvoir antimicrobien de ces extraits sur la production de l'azote basique volatil total (ABVT) et l'évolution des charges bactériennes dans la sardine en énumérant les germes aérobies totaux, les coliformes totaux, les bactéries lactiques et les bactéries formant histamine. Dans un deuxième temps, afin de proposer des solutions, permettant de limiter le développement des réactions d'oxydation des lipides responsable de la dégradation de la sardine au cours de sa conservation, l'activité antioxydante des conservateurs naturels a été évaluée par la détermination de l'indice de peroxyde (PV) et des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (SR-TBA). Enfin, l'effet de chaque extrait sur la production des amines biogènes dans les filets de sardine a été étudié afin d'estimer l'intérêt de ces conservateurs naturels sur la sécurité sanitaire alimentaire.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités

1.1. *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) « Sardine d'Europe »

La sardine d'Europe est une espèce marine pélagique et néritique. Elle vit donc jusqu'à 120 m de profondeur. Elle nage en bancs et se rapproche de la surface la nuit. La mâchoire est légèrement saillante. L'opercule est marqué de stries bien nettes. Le corps est recouvert de grandes écailles liées qui tombent aisément. La carène ventrale est peu développée et il n'y a pas de nageoire adipeuse. La nageoire dorsale débute en avant des pelviennes. La nageoire anale se termine par deux rayons plus longs que les autres. Elle mesure habituellement entre 10 à 20 cm, mais peut mesurer jusqu'à 25 cm (Quéro, 1997) (cf. figure n° 1).

Sardina pilchardus évolue en Atlantique Nord-Est, de l'Islande et la Norvège au Sénégal. On la retrouve également en Méditerranée, notamment dans sa partie occidentale, et jusqu'en mer Noire. Elle effectue des migrations de la larve vers la côte au printemps, dans l'autre sens en hiver. Le frai a lieu toute l'année. La nourriture se compose de crustacés planctoniques (copépodes), de larves de crabes et d'ophiures (échinodermes) (Quéro, 1997).

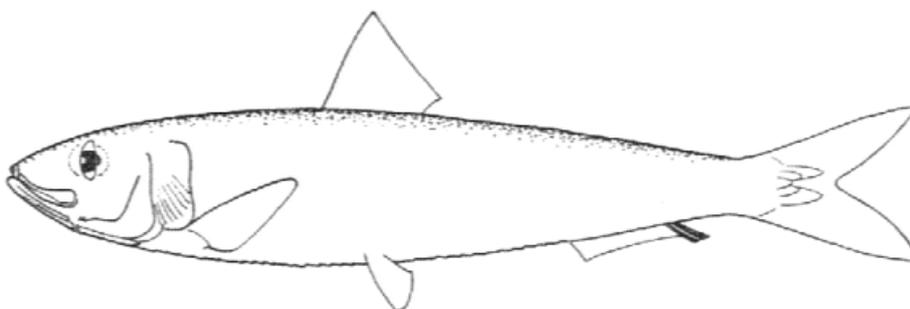


Figure n° 1 : *Sardina pilchardus* «Sardine d'Europe» (Quéro, 1997).

La sardine est pêchée à la bolinche (la senne coulissante), et de plus en plus au chalut pélagique. En méditerranée, on la capture la nuit et à la lumière (lamparo). Sa pêche est très fluctuante d'une année à l'autre provoquant de graves crises. Sa chair fine, un peu grasse est très estimée est consommée fraîche et salée, parfois fumée mais principalement en conserve (Quéro, 1997).

1.2. Composition chimique du poisson

La composition globale dans la plupart des poissons et crustacés est principalement de l'eau, des protéines et des lipides (cf. tableau n° 1). Dans la chair de poisson, ces constituants représentent environ 98%, et les autres constituants mineurs comprennent les glucides, les vitamines et les minéraux (Sikorski et al., 1990). Cependant, la composition chimique du poisson varie considérablement d'une espèce et d'un individu à l'autre selon l'âge, le sexe, la taille, l'environnement et la saison. La composition spécifique du poisson lui donne une qualité nutritionnelle et sensorielle que recherchent et apprécient les consommateurs.

Tableau n° 01 : Principaux composants (%) des muscles de poisson (Stansby, 1962 ; Love, 1970).

Constituant	Poisson (filet)		
	Minimum	Intervalle normal	Maximum
Eau	28	66-81	96
Protéines	6	16-21	28
Lipides	0.1	0.2-25	67
Hydrates de carbone		<0.5	
Cendres	0.4	1.2-1.5	1.5

La fraction lipidique est le composant qui subit les variations les plus importantes. Ces variations dépendent de plusieurs facteurs tels que l'âge, le cycle sexuel, l'alimentation et les facteurs environnementaux (Corraze and Kaushik, 1999). La teneur en lipides des filets de poissons maigres est basse et stable alors que la teneur en lipides des poissons gras est extrêmement variable.

Les lipides du poisson sont formés principalement par des phospholipides et des triglycérides. Les lipides des muscles des poissons maigres contiennent des triglycérides (35 % des lipides totaux) et une forte proportion de phospholipides (65 %) intimement associés aux protéines car constitutifs des membranes cellulaires. Dans le groupe des poissons gras, les lipides sont surtout constitués de lipides neutres, essentiellement des triglycérides. Les diglycérides et monoglycérides étant essentiellement issus de l'hydrolyse des triglycérides au sein du muscle sont présents en très faibles quantités. Les divers acides gras sont répartis d'une manière très hétérogène conduisant ainsi à une grande variété d'espèces moléculaires

de triglycérides. Les lipides polaires, essentiellement des phospholipides, contiennent généralement de fortes proportions d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne. Ils jouent un rôle structural et fonctionnel dans les membranes cellulaires. En plus des phospholipides, les membranes contiennent aussi du cholestérol qui contribue à leur rigidité (Huss, 1999).

Les lipides du poisson incluent jusqu'à 40% d'acides gras à longue chaîne qui sont hautement insaturés. Ces acides gras rendent le poisson très sensible à l'oxydation selon un mécanisme autocatalytique (Huss, 1999).

Les protéines des tissus musculaires du poisson peuvent être divisées en trois groupes : les protéines structurales (actine, myosine, tropomyosine et actomyosine), les protéines sarcoplasmiques (myoalbumine, globuline et enzymes), et les protéines du tissu conjonctif (collagène) (Huss, 1999). Les protéines du poisson renferment tous les acides aminés essentiels qui ont une très haute valeur biologique. Le poisson est une excellente source d'acides aminés soufrés (méthionine et cystéine) et peut par conséquent, améliorer de façon significative la valeur biologique dans des régimes basés essentiellement sur les céréales (Huss, 1999).

Les extraits azotés ou la fraction ANP (Azote non protéique) constituent de 9 à 18% de l'azote dans les téléostéens. Les composants principaux de cette fraction sont: des bases volatiles telles que l'ammoniac et l'oxyde de triméthylamine (OTMA), la créatine, les acides aminés libres, les bases nucléotides et les bases puriques et, dans le cas des poissons cartilagineux, l'urée (Huss, 1999). L'OTMA constitue une part importante et caractéristique de la fraction ANP dans les espèces marines et mérite plus d'attention. Ce composant se trouve dans toutes les espèces de poissons marins, à des taux variant de 1 à 5% du tissu musculaire (poids net) mais est pratiquement absent chez les poissons d'eau douce et les organismes terrestres (Anderson and Fellers, 1952 ; Hebard et al., 1982). La quantité d'OTMA dans le tissu musculaire dépend de l'espèce, de la saison, des zones de pêche etc. Selon Tokunaga (1970), les poissons pélagiques (sardines, thon, maquereau) ont leur concentration la plus forte en OTMA dans le muscle rouge alors que les poissons démersaux à chair blanche ont un pourcentage bien plus important dans le muscle blanc.

Quantitativement le principal constituant de la fraction ANP est la créatine. Dans un poisson au repos, la plus grande partie de la créatine est phosphorylée et fournit de l'énergie pour la contraction musculaire. La fraction ANP contient également une teneur assez

importante en acides aminés libres. Ceux-ci représentent 630 mg/100 g de muscle blanc dans le maquereau (*Scomber scombrus*), de 350 à 420 mg/100 g dans le hareng (*Clupea harengus*) et de 310 à 370 mg/100 g dans le capelan (*Mallotus villosus*). L'importance relative de ces acides aminés varie selon les espèces. La taurine, l'alanine, la glycine et les acides aminés contenant l'imidazole semblent prédominer dans la plupart des poissons. Parmi ces acides aminés à noyau imidazole, l'histidine a beaucoup attiré l'attention car elle peut être microbiologiquement décarboxylée en histamine. Les espèces actives à chair rouge comme la sardine, le thon et le maquereau ont une forte teneur en histidine (Huss, 1999).

Les glucides peuvent aussi être divisés en trois groupes : les sucres (mono- et disaccharides), les oligosaccharides (3 à 9 monosaccharides), et les polysaccharides (plus de 9). La teneur en glucides dans le muscle du poisson est faible (Mendel et al., 1954 ; Schulz et al., 2005) et est influencée par les techniques de pêche, qui peut conduire à l'épuisement des réserves de glycogène et ainsi à une diminution du niveau de glucide.

En ce qui concerne les vitamines, la chair du poisson est une bonne source de vitamines B et également, dans le cas des espèces grasses, de vitamines A et D. La chair du poisson est également considérée comme une source appréciable de calcium et de phosphore en particulier mais également de fer, cuivre et sélénium. Les poissons d'eau de mer ont une forte teneur en iode (Huss, 1999).

1.3. Microbiologie du poisson

1.3.1. Microflore naturelle (ou indigène)

Les micro-organismes se trouvent sur toute la surface externe (peau et branchies) et dans les intestins des poissons vivants et fraîchement pêchés. Le nombre varie énormément allant de 10^2 à 10^7 UFC (unités formant colonies)/cm² de surface de peau (Liston, 1980) et de 10^3 à 10^9 UFC/g de branchies ou d'intestins (Shewan, 1962).

La flore bactérienne du poisson fraîchement pêché dépend de l'environnement dans lequel il a été capturé, plus que de l'espèce de poisson. Le poisson pêché dans des eaux propres et très froides a la charge bactérienne la plus faible alors que celle du poisson pêché dans les eaux chaudes est légèrement plus élevée. Concernant les espèces de bactéries, on en rencontre plusieurs à la surface du poisson. Elles se classent en psychrotrophes ou psychrophiles. Selon leurs intervalles de température de croissance les psychrotrophes

(supportant le froid) sont capables de se développer à 0 °C mais avec un optimum aux environs de 25 °C. Les psychrophiles (aimant le froid) possèdent une température maximale de croissance aux environs de 20 °C et une température optimum à 15 °C (Morita, 1975). Les mésophiles sont isolés en nombres importants à partir des poissons des eaux plus chaudes. La microflore des poissons d'eaux tempérées est dominée par les bactéries psychrotrophes à Gram négatif en forme de bâtonnets appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella* et *Flavobacterium*. Les membres de la famille des *Vibrionaceae* (*Vibrio* et *Photobacterium*) et des *Aeromonadaceae* (*Aeromonas* sp.) sont aussi des bactéries aquatiques courantes et typiques de la flore du poisson. Des bactéries à Gram positif comme *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* et corynéformes peuvent également être trouvés en quantités variables, mais ce sont généralement les bactéries à Gram négatif qui prédominent.

En outre, de fréquents isolements à partir de produits de la pêche et la démonstration du potentiel de croissance dans le saumon fumé réfrigéré (+4 °C) montrent que les produits de la pêche peuvent jouer un rôle important dans la transmission de *Listeria monocytogenes*. Les *Listeria* sp. autres que *L. monocytogenes* semblent plus communes dans les régions tropicales. (Fuchs et Reilly, 1992). En revanche, on peut trouver des niveaux élevés de bactéries indigènes sur les produits de la pêche s'il y a eu prolifération. Cette situation représente un danger sérieux, avec de forts risques d'entraîner des maladies. Il convient par conséquent d'empêcher la prolifération et l'éventuelle production de toxines (Huss, 1995).

1.3.2. Microflore de contamination (ou non indigène) :

Elle est véhiculée aux produits de la pêche par l'homme, les eaux usées, la glace, les parois du bateau, les caisses, etc. Elle contamine le poisson accidentellement et contribue à son altération ou bien conduit à des accidents chez le consommateur. Le tableau n° 2 regroupe les bactéries pathogènes non indigènes des produits de la pêche.

Tableau n° 02 : Les bactéries pathogènes non indigènes des produits de la pêche (Huss, 1995).

Bactéries non indigènes	Mode d'action		Stabilité de la toxine à la chaleur	Dose infective minimum
	Infection	Toxine préformée		
<i>Salmonella spp.</i>	+			de $< 10^2$ à $> 10^6$
<i>Shigella</i>	+			10^1-10^2
<i>E. coli</i>	+			10^1-10^{3*}
<i>Staphylococcus aureus</i>		+	élevée	–

* Pour la souche productrice de vérotoxine O157:H7.

1.4. Modifications post-mortem du poisson

L'altération des produits de la pêche s'accompagne de trois types de changements: sensorielles, autolytiques et bactériologiques. Elle peut être appréciée par des méthodes organoleptiques et des méthodes analytiques (chimiques et microbiologiques).

1.4.1. Changements sensoriels

Les changements sensoriels sont ceux perçus par les sens, il s'agit de modifications de l'apparence, de l'odeur, de la texture et du goût. Les premières modifications sensorielles du poisson pendant le stockage concernent l'apparence et la texture. Le goût caractéristique des espèces se développe normalement pendant les deux premiers jours de la conservation sous glace.

Le changement le plus important est l'établissement de la rigidité cadavérique ou *rigor mortis*. Immédiatement après la mort, le muscle est totalement détendu et la texture élastique et souple, dure habituellement quelques heures. Ensuite, le tissu musculaire se contracte. Quand il durcit, le corps se raidit et le poisson est alors en état de rigidité cadavérique. Cet état dure habituellement un jour ou plus et alors la *rigor* disparaît, ce qui détend le muscle à nouveau et le rend souple mais il n'est plus aussi élastique qu'avant la *rigor*. Le rapport entre l'apparition et la disparition de la rigidité cadavérique varie d'une espèce à l'autre et est affecté par la température, la manutention, la taille, la méthode de pêche et la condition physique du poisson (Huss, 1999).

La *rigor mortis* s'installe immédiatement ou très rapidement après la mort quand le poisson est affamé et que les réserves de glycogène sont épuisées ou si le poisson est fatigué. La méthode utilisée pour étourdir et tuer le poisson influence également l'apparition de la *rigor*. La signification technologique de la *rigor mortis* a une importance majeure si le poisson est fileté avant ou pendant la *rigor*. Pendant la *rigor*, le corps du poisson sera complètement raide; le rendement du filetage sera très mauvais et une manutention brutale peut produire des déchirures (Huss, 1999).

1.4.2. Altérations autolytiques

Le système enzymatique du poisson lui-même et particulièrement celui du tractus digestif, est en général le premier responsable du début d'altération car il prépare le milieu au développement bactérien, surtout les enzymes des intestins qui attaquent, ramollissent et modifient la paroi abdominale, permettant ainsi la pénétration des bactéries, cette action enzymatique est désignée sous le nom d'autolyse ou "l'autodigestion" (Sainclivier, 1983).

1.4.2.1. Evolution du pH

Juste après la capture, le pH musculaire est légèrement alcalin, il est de l'ordre de 7.05–7.35. Après la mort, le glycogène présent dans la chair du poisson se transforme en acide lactique (glycogénolyse par voie anaérobie), ce qui provoque un abaissement du pH, on se trouve dans la phase de *rigor-mortis*. Ensuite, apparaissent dans la chair musculaire des produits de dégradation des acides aminés libres, et le pH final est plus élevé, ce qui rend la chair de poisson plus vulnérable à l'attaque microbienne. Les valeurs du pH au niveau de la phase de *rigor-mortis* sont spécifiques à chaque espèce à cause des variations de la teneur en glycogène existantes d'une espèce à l'autre (Sainclivier, 1983).

1.4.2.2. Oxydation et hydrolyse des lipides

Les deux réactions distinctes impliquant les lipides du poisson et d'intérêt pour l'altération de sa qualité sont l'oxydation et l'hydrolyse. Il en résulte la production d'une série de substances dont certaines ont une odeur et un goût désagréables (de rance). Certaines peuvent également modifier la texture par des liaisons covalentes avec les protéines des muscles du poisson. Les différentes réactions sont, soit *non-enzymatiques*, soit catalysées par des enzymes *microbiennes* ou *intracellulaires* ou *digestives* provenant du poisson lui-même.

De ce fait, l'importance relative de ces réactions dépend surtout des espèces de poissons et de la température de conservation. Les poissons gras sont évidemment très sensibles à la dégradation des lipides, ce qui peut créer de sérieux problèmes de qualité, même à des températures de conservation inférieures à 0 °C (Huss, 1999).

- **Oxydation**

De nombreuses fractions d'acides gras polyinsaturés présentes dans les lipides du poisson les rendent très sensibles à l'oxydation selon un mécanisme autocatalytique. Contrairement à la molécule native, le radical lipidique (L^\bullet) réagit très rapidement avec l'oxygène atmosphérique formant un radical peroxyde (LOO^\bullet) qui, à son tour, peut extraire un hydrogène d'une autre chaîne acyle, ce qui donne un hydroperoxyde lipidique (LOOH) et un nouveau radical L^\bullet . Cette préparation se poursuit jusqu'à ce qu'un des radicaux soit éliminé par réaction avec un autre radical ou avec un antioxydant (AH) dont le radical résultant (A^\bullet) est beaucoup moins réactif. Les hydroperoxydes produits en quantités relativement importantes pendant la réaction sont sans goût et, par conséquent, il n'est peut-être pas surprenant que l'indice de peroxyde largement utilisé n'ait souvent que peu de relations avec les propriétés sensorielles (Huss, 1999).

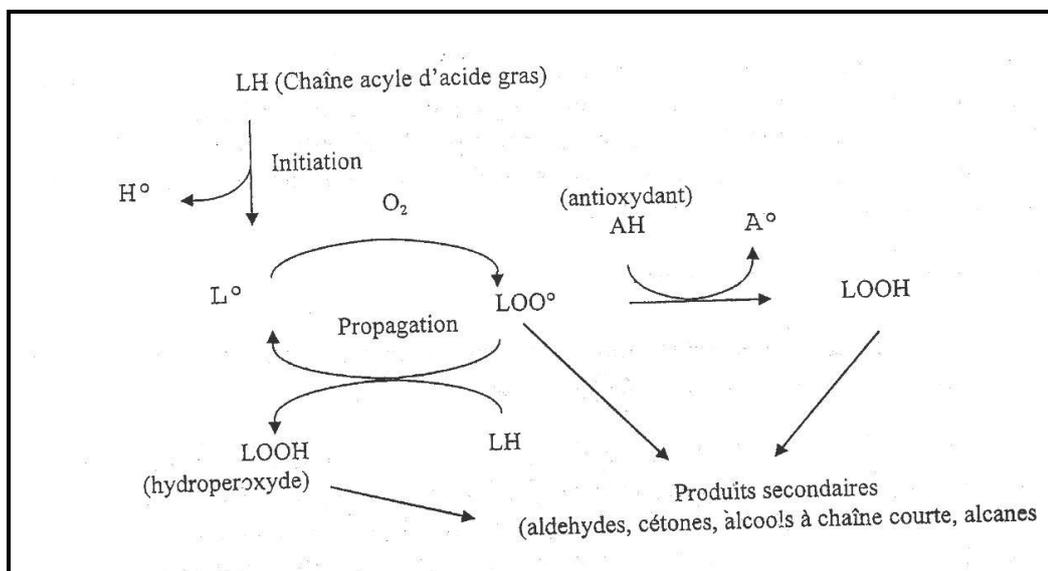


Figure n° 2 : Auto-oxydation des lipides polyinsaturés (Huss, 1999).

Les hydroperoxydes se dégradent facilement. Cette dégradation est catalysée par les ions de métaux lourds, et résulte en produits secondaires d'auto-oxydation de chaîne carbonée plus courte, essentiellement des aldéhydes, des cétones, des alcools, des acides carboxyliques et des alcanes responsables d'un spectre très large d'odeurs et, dans certains cas, d'une coloration jaunâtre (cf. figure n° 2). Plusieurs des aldéhydes peuvent être déterminés comme SR-TBA "substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique" (Huss, 1999).

Les ions métalliques jouent un rôle très important durant la première étape de l'auto-oxydation des lipides en catalysant la synthèse de formes très réactives d'oxygène comme par exemple le radical hydroxyle (OH^{\bullet}). Ce radical réagit immédiatement avec les lipides ou autres molécules sur le site où il est généré. La forte réactivité peut expliquer le fait que les acides gras libres sont plus sensibles à l'oxydation que ceux qui étaient liés, parce que la quantité de fer dans la phase aqueuse est probablement plus importante que celle liée à la surface des membranes cellulaires et aux gouttelettes de lipides (Huss, 1999).

Les hydroperoxydes d'acides gras peuvent également être formés par voie enzymatique, suite à la catalyse par la *lipoxigénase* présente en quantités variables dans divers tissus de poisson (cf. figure n° 3). Cette enzyme est instable et est probablement importante pour l'oxydation lipidique uniquement dans le poisson frais. La cuisson ou la congélation/décongélation détruisent assez efficacement son activité (Huss, 1999).

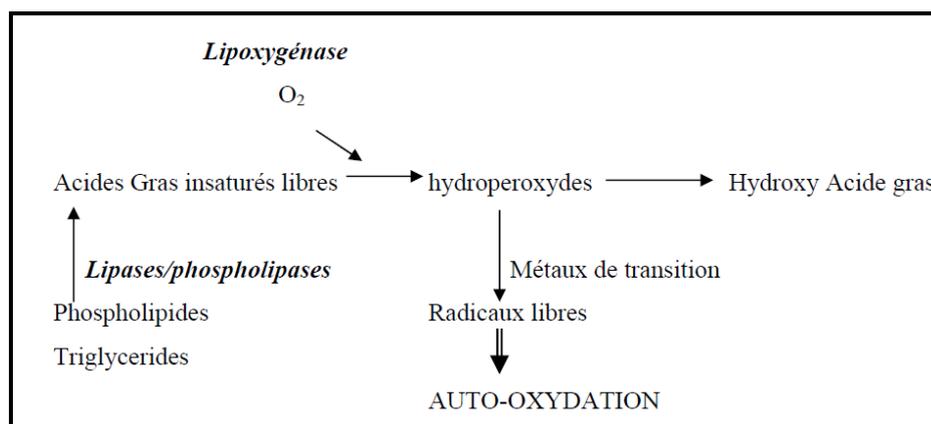


Figure n° 3 : Mécanisme d'initiation de la peroxydation des lipides par l'activité lipoxigénasique (German et al., 1985).

- **Hydrolyse**

Au cours du stockage, une quantité considérable d'acides gras libres (AGL) s'accumule. Le phénomène est plus sensible dans le poisson non éviscéré que dans le poisson éviscéré sans doute à cause de l'action d'enzymes digestives. Les triglycérides dans les dépôts de graisses sont scindés par la lipase triglycéride, issue du tractus intestinal ou excrétée par certains micro-organismes. Les lipases cellulaires peuvent également jouer un rôle mineur. Dans le poisson maigre, tel que le cabillaud de l'Atlantique, il y a production d'acides gras libres, même à basses températures. On suppose que les enzymes responsables sont les phospholipases cellulaires - en particulier les phospholipases A₂ (Huss, 1999).

Les acides gras liés aux phospholipides au niveau du carbone 2 du glycérol sont surtout du type polyinsaturé, et, par conséquent, l'hydrolyse conduit également souvent à une oxydation plus poussée. De plus, les acides gras eux-mêmes peuvent donner un arrière-goût de savon (Huss, 1999).

1.4.2.3. Dégradation des nucléotides

Après la mort, une des premières modifications qu'on décèle est la dégradation des composés reliés à l'ATP de manière plus ou moins prévisible pour former l'adénosine diphosphate (ADP), l'adénosine monophosphate (AMP), l'inosine monophosphate (IMP), l'inosine (Ino) et l'hypoxanthine (Hx). La dégradation des catabolites de l'ATP s'effectue de la même manière dans la plupart des poissons, mais la vitesse de chaque réaction individuelle (d'un catabolite à l'autre) varie beaucoup d'une espèce à l'autre (Huss, 1999). Saito et al. (1959) ont été les premiers à observer ce schéma et à développer une formule pour la fraîcheur du poisson basée sur ces changements autolytiques :

$$K(\%) = \left[\frac{\text{Ino} + \text{Hx}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP} + \text{IMP} + \text{Ino} + \text{Hx}} \right] \times 100$$

où [ATP], [ADP], [AMP], [IMP], [Ino] et [Hx] représentent les concentrations relatives de ces composants dans le muscle du poisson, mesurées à différentes périodes pendant la conservation au froid.

Le facteur K ou indice de "fraîcheur" donne une estimation de fraîcheur relative basée principalement sur les altérations autolytiques qui se produisent pendant la conservation *post mortem* du muscle. Par conséquent, plus la valeur de K est élevée, plus le niveau de fraîcheur est bas. La valeur initiale et finale du facteur K est variable selon l'espèce, le mode de capture, le sexe, le stade physiologiques et la saison (Huss, 1999). De même, la dégradation des catabolites de nucléotides n'est qu'une coïncidence dans les changements perceptibles de la fraîcheur et n'est pas reliée nécessairement à la cause de la détérioration de la fraîcheur, du fait que l'on considère que seul l'hypoxanthine (Hx) aurait un effet direct sur l'arrière-goût amer du poisson altéré. Aujourd'hui, on considère généralement que l'IMP est responsable du goût recherché de poisson frais qui n'existe que dans les produits de la pêche de première qualité. Aucun des catabolites de nucléotides n'est considéré comme ayant un rapport avec les changements perceptibles de texture pendant le processus autolytique excepté bien sûr l'ATP dont la perte est associée à la *rigor mortis* (Huss, 1999).

1.4.2.4. Dégradation des protéines

De nombreuses protéases (cathepsines, calpaines et collagénases) ont été isolées des muscles du poisson et les effets de la dégradation protéolytique sont souvent reliés à un ramollissement considérable du tissu. Un des effets les plus notables de la protéolyse autolytique est peut-être l'éclatement de l'abdomen chez les espèces pélagiques (poissons gras) comme la sardine, le hareng et le capelan. L'autolyse accélérerait le développement des bactéries d'altération en fournissant un environnement favorable à leurs croissances (Aksnes et Brekken, 1988). Botta et al. (1992) ont trouvé que l'autolyse de la cavité viscérale (éclatement abdominal) des harengs était d'avantage reliée à la manutention physique qu'à des facteurs biologiques comme la taille du poisson, les aliments dans les viscères ou la quantité de roque. En particulier, pour le hareng, les opérations de congélation et décongélation, le temps de décongélation à 15 °C et le temps de stockage sous glace influent plus sur l'éclatement abdominal que les facteurs biologiques.

1.4.2.5. Réduction de l'oxyde de triméthylamine (OTMA)

Certaines des bactéries présentes dans le poisson peuvent respirer avec production avantageuse d'ATP en utilisant d'autres molécules comme accepteur d'électrons. C'est ainsi que plusieurs bactéries spécifiques d'altération du poisson ont la particularité de pouvoir

utiliser l'OTMA comme accepteur d'électrons par respiration anaérobie. Le produit de cette réduction, la TMA, est l'un des composants dominants du poisson altéré caractérisé par une odeur typique. Le niveau de TMA, à partir duquel les panels d'évaluation sensorielle rejettent le poisson, varie suivant les espèces mais se situe typiquement autour de 10-15 mg de TMA-N/100 g dans le poisson conservé en aérobiose et à un niveau de 30 mg TMA-N/100 g dans le cabillaud emballé (Dalgaard, 1993). La réduction de l'OTMA est surtout associée au genre de bactéries typiques de l'environnement marin (*Alteromonas*, *Photobacterium*, *Vibrio* et *Shewanella putrefaciens*), mais est effectuée par *Aeromonas* et les bactéries intestinales de la famille des *Enterobacteriaceae* (Huss, 1999).

L'OTMA est un composant typique des poissons marins. Toutefois, il a été récemment rapporté que certains poissons tropicaux d'eau douce contenaient de grandes quantités d'OTMA (Anthoni et al., 1990). Cependant, la TMA n'est pas nécessairement un produit de l'altération de tels poissons puisque celle-ci est due aux espèces de *Pseudomonas* (Gram et al., 1990) qui ne réduisent pas l'OTMA. Le développement de la TMA s'accompagne dans de nombreuses espèces de poissons de la production d'hypoxanthine qui peut être formée par la décomposition autolytique des nucléotides. Mais elle peut aussi être formée par les bactéries et le taux de formation bactérienne est plus élevé que celui de l'autolyse (Huss, 1999).

Dans le cabillaud et autres gadidés, la TMA constitue la plus grande partie de ce que l'on appelle l'azote basique volatil total ou l'ABVT jusqu'à l'altération. Cependant, dans le poisson altéré où l'OTMA est épuisé et où la TMA a atteint son niveau maximal, les niveaux d'ABVT s'élèvent encore du fait de la formation de NH_3 et d'autres amines volatiles. L'ABVT continuera d'augmenter même lorsque la TMA aura atteint son maximum. La croissance de ce dernier est due à la protéolyse qui commence lorsque plusieurs acides aminés libres ont été utilisés. Dans certains poissons qui ne contiennent pas d'OTMA ou dont la dégradation est due à une flore non réductrice de l'OTMA, on observe une faible augmentation d'ABVT pendant la conservation, résultant probablement de la désamination des acides aminés (Huss, 1999).

La formation de TMA s'accompagne d'un dégagement d'ammoniac pendant la conservation anaérobie de harengs et de maquereaux (Haaland et Njaa, 1988). Une conservation en anaérobiose prolongée du poisson donne une importante production de NH_3 due à une dégradation plus poussée des acides aminés et à une accumulation d'acides gras

plus faibles tels que les acides acétique, butyrique et propionique. Pendant la conservation sous glace du poisson gras frais, les modifications de la fraction lipidique sont presque exclusivement d'origine chimique, par exemple l'oxydation, alors que l'attaque bactérienne de la fraction lipidique contribue peu à l'altération. Toutefois, l'hydrolyse bactérienne des lipides peut faire partie du processus d'altération pendant le stockage du poisson ayant subi un traitement de préservation léger (Huss, 1999).

Toutefois, dans les poissons congelés, l'action bactérienne est inhibée et l'OTMA est décomposé par des enzymes autolytiques en diméthylamine (DMA) et en formaldéhyde (FA). Le formaldéhyde formé dans le poisson congelé a pour effet une dénaturation accrue des tissus du poisson, des changements de texture et une perte de la capacité de rétention de l'eau. On estime également que d'autres réactions enzymatiques, telles que la formation d'acides gras libres, influent considérablement sur la qualité organoleptique du poisson congelé (Huss, 1995).

1.4.2.6. Dégradation des acides aminés

La majorité des odeurs dégagées lors de l'altération du poisson est le produit de la dégradation des acides aminés. Les composés soufrés volatils sont typiques du poisson en cours d'altération et la plupart des bactéries d'altération produisent un ou plusieurs de ces composés. *Shewanella putrefaciens* et quelques *Vibrionaceae* produisent du H₂S à partir de la L-cystéine, acide aminé soufré (Gram et al., 1987). Le méthylmercaptan (CH₃SH) et le diméthylsulfure ((CH₃)₂ S) sont tous deux formés à partir de l'autre acide aminé soufré, la méthionine. Ils confèrent au poisson une odeur fétide et sont perceptibles à des niveaux très faibles, compromettant ainsi fortement la qualité. La taurine, qui contient également du soufre, est présente comme acide aminé libre en très forte concentration dans les muscles du poisson, elle disparaît de la chair du poisson au cours du stockage à cause de diffusion plutôt que d'une attaque bactérienne (Herbert et Shewan, 1975).

Des odeurs et saveurs fruitées, putrides et sulfydriques sont typiques de l'altération du poisson glacé par *Pseudomonas*. Ces bactéries produisent plusieurs aldéhydes, cétones, esters et sulfures volatils. Cependant, les composés responsables des mauvaises odeurs typiques ne sont pas connus. Les mauvaises odeurs fruitées produites par *Pseudomonas fragi* proviennent des acides aminés mono-aminés et monocarboxyliques.

Des composés aromatiques et N-cycliques sont formés à partir de phénylalanine, tyrosine et tryptophane. De même, la valine, la leucine et l'isoleucine sont des précurseurs d'alcools et de carbonyles à courtes chaînes (Huss, 1999). La dégradation des acides aminés est également responsable de la formation d'amines biogènes comme l'histamine, la tyramine, la putrescine et la cadaverine, dérivant respectivement de l'histidine, la tyrosine, l'arginine, et la lysine (cf. chapitre les amines biogènes).

1.4.3. Changements bactériologiques

Même si les réactions d'autolyse initient l'altération du poisson, les micro-organismes sont responsables des principales modifications organoleptiques conduisant à rendre le poisson impropre à la consommation humaine. On parle alors de l'invasion microbienne.

✓ Invasion microbienne :

La chair du poisson sain, vivant ou fraîchement pêché est stérile car le système immunitaire du poisson empêche les bactéries de se multiplier dans sa chair. À la mort du poisson, le système immunitaire s'effondre et les bactéries peuvent proliférer librement. Après une phase de latence dont la durée dépend de la température, les bactéries se multiplient rapidement pour atteindre en condition aérobie des taux de l'ordre de 10^8 - 10^9 germes par gramme de chair ou cm^2 de peau lorsque l'altération devient détectable (Huss, 1999).

Les micro-organismes se rencontrent sur la peau, les intestins et les branchies. Pendant le stockage, elles envahissent la chair à travers le système vasculaire ou la peau. Cependant, l'examen de coupes histologiques a montré que pour le poisson conservé sous glace, seul un nombre très limité de bactéries envahissent la chair et que le développement microbien se situe essentiellement à la surface, l'altération s'avère probablement, pour une grande part, être une conséquence de la diffusion des enzymes bactériennes dans la chair et des substrats tissulaires à l'extérieur (Huss, 1999).

Le poisson s'altère à des vitesses très variables. Certains auteurs expliquent ce fait par des différences dans les propriétés de la surface du poisson. Les peaux des poissons ont des textures très différentes. Ainsi, le merlan (*Merlangius merlangus*) et le cabillaud (*Gadus morhua*), qui ont un tégument très fragile et facilement détérioré pendant la manutention,

s'altèrent rapidement comparés à différents poissons plats comme le carrelet qui possède un derme et un épiderme très robustes. Ces derniers ont de plus une couche épaisse de mucus qui comprend plusieurs substances antibactériennes tels que des anticorps et des enzymes bactériolytiques (Murray et Fletcher, 1976 ; Hjelmeland et al., 1983).

La température de stockage et la quantité d'oxygène disponible sont les principaux facteurs influençant la vitesse d'altération. Selon les conditions de conservation, une ou plusieurs espèces de bactéries sont principalement responsables des phénomènes d'altération, on parle d'organisme spécifique d'altération (SSO ou specific spoilage organism). Pendant la conservation sous glace, les bactéries vont doubler pratiquement chaque jour et, après 2 à 3 semaines, elles auront atteint $10^8 - 10^9$ UFC/g de chair ou par cm^2 de peau. Pendant la conservation à température ambiante, elles atteignent près de 10^7-10^8 UFC/g en 24 heures. Les bactéries des poissons capturés dans les eaux tropicales passeront souvent par une phase de latence de 1 à 2 semaines si le poisson est conservé sous glace, après quoi la croissance exponentielle commence. Au cours de la dégradation, le niveau bactérien des poissons tropicaux est semblable à celui observé sur les espèces de poissons des eaux tempérées (Gram, 1990 ; Gram et al., 1990).

Si le poisson glacé est conservé dans des conditions anaérobies ou dans une atmosphère contenant du CO_2 , le nombre de bactéries psychrotrophes telles que *S. putrefaciens* et *Pseudomonas* est souvent bien plus faible, c'est-à-dire 10^6-10^7 UFC/g, que sur le poisson conservé en aérobiose. La composition de la microflore varie également de façon très importante pendant le stockage. Ainsi, dans la conservation sous glace en aérobiose, la flore est composée presque exclusivement de *Pseudomonas* sp. et *S. putrefaciens* après 1 à 2 semaines. Ceci serait dû à leur temps de génération relativement court à basse température (Morita, 1975 ; Devaraju et Setty, 1985) et se vérifie pour toutes les études menées sur du poisson qu'il soit tropical, ou d'eaux tempérées. À température ambiante (25 °C), la microflore au stade de l'altération est dominée par les mésophiles, notamment des *Vibrionaceae*, et par des *Enterobacteriaceae* si les poissons sont pêchés dans des eaux polluées. *Shewanella putrefaciens* a été identifiée comme la bactérie responsable de l'altération du poisson des eaux tempérées conservé en aérobiose sous glace. Si le produit est emballé sous vide, *Photobacterium phosphoreum* participe à l'altération et devient la bactérie spécifique de l'altération du poisson emballé sous CO_2 .

2. Amines biogènes

Par définition, les amines biogènes sont des composés azotés basiques formés principalement par la décarboxylation des acides aminés ou par l'amination et la transamination des aldéhydes et des cétones (Askar et Treptow, 1986 ; Maijala et al., 1993). Les amines biogènes sont des bases organiques de faible masse moléculaire, et en fonction de la structure chimique peuvent être soit aliphatique (la putrescine, la cadavérine, la spermine, la spermidine), aromatique (la tyramine, la β -phényléthylamine) ou hétérocyclique (l'histamine, la tryptamine). Ces composés sont synthétisés par le métabolisme microbien, végétal et animal (ten Brink et al., 1990). Les polyamines telles que la putrescine, la spermidine, la spermine et la cadaverine sont des composantes fondamentales des cellules vivantes qui jouent un rôle important dans la régulation de la fonction des acides nucléiques, la synthèse protéique et probablement la stabilisation des membranes (Bardócz et al., 1993 ; Maijala et al., 1993 ; Halász et al., 1994). La Figure n° 4 présente les amines biogènes et leurs précurseurs chimiques.

Initialement, on pensait que l'autolyse de poisson était la principale voie de formation des amines biogènes. Cependant, des études plus approfondies ont montré que la production des amines biogènes signalées par certains chercheurs est causée par une contamination bactérienne précédente ou par un procédé de stérilisation insuffisant (Arnold et Brown, 1978).

L'histamine, la putrescine et la cadaverine sont des diamines qui peuvent être produites de la décarboxylation *post-mortem* des acides aminés spécifiques dans les poissons et les tissus de mollusques (Santos, 1996). Les amines biogènes présentes dans le poisson sont presque totalement le résultat de l'action des enzymes exogènes libérées par les divers micro-organismes associés aux produits de la pêche (Frank et al., 1981). Les enzymes endogènes de décarboxylation naturellement présentes dans le poisson ou les tissus de mollusques peuvent également contribuer à cette production. Cette voie est toutefois négligeable par rapport à la production exogène (Wendakoon et Sakaguchi, 1992). Cependant, la forte teneur en acides aminés libres dans le poisson et la forte activité des enzymes protéolytiques présentes dans les viscères sont les principaux facteurs responsables du développement rapide du processus autolytique (Gildberg, 1978 ; Aksnes, 1988).

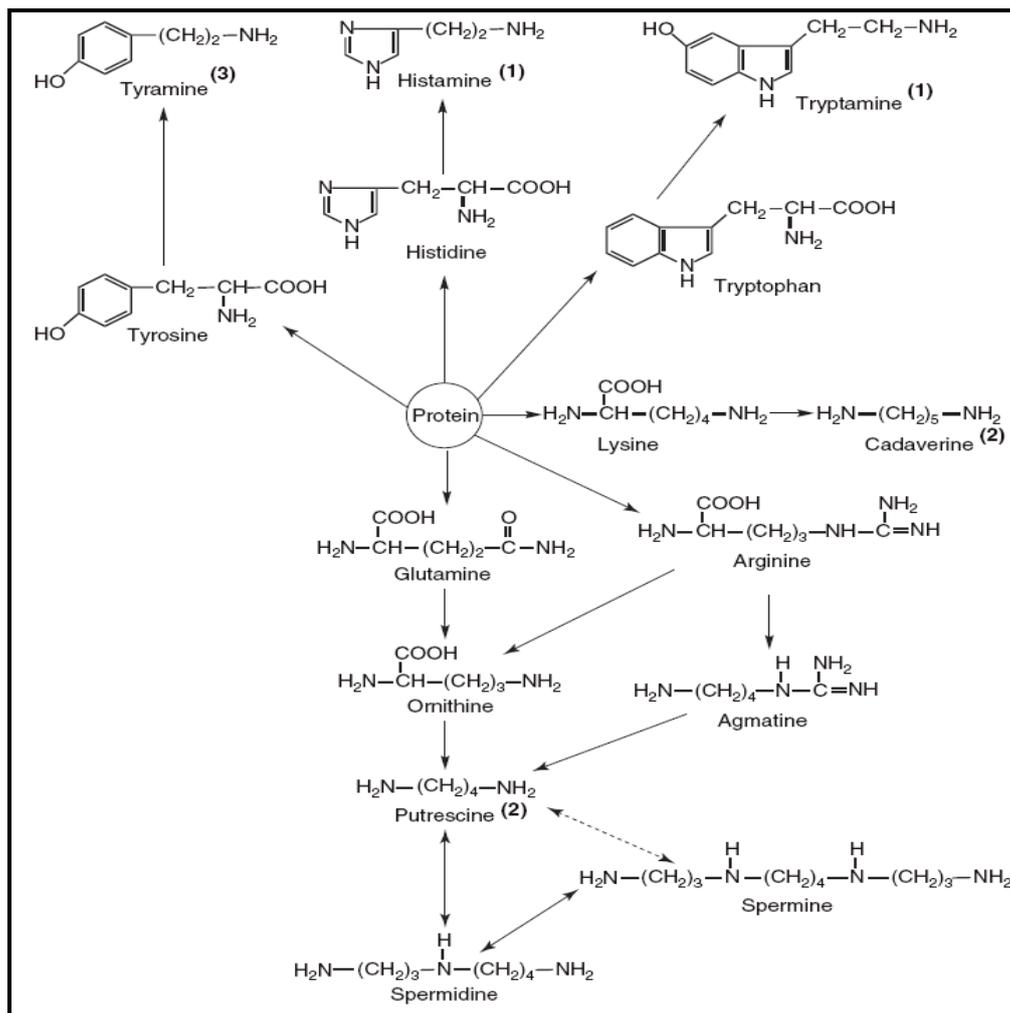


Figure n° 4: Les voies métaboliques de la formation des amines biogènes dans le poisson: (1) une amine hétérocyclique, (2) une amine aliphatique, (3) une amine aromatique (Adapté par Halász et al., 1994).

2.1. Toxicité des amines biogènes dans le poisson

La consommation des aliments contenant de fortes concentrations d'amines biogènes s'accompagne toujours des effets toxiques et constitue un danger potentiel pour la santé publique. Les composés principalement impliqués dans ces effets toxiques sont l'histamine et la tyramine. L'histamine est l'amine biogène la plus importante dans le poisson et ses produits de transformation. Elle est le composant principal dans le "Scombrotisme" ou "l'intoxication histaminique" causé par la consommation de poissons contenant des taux élevés d'histamine et/ou d'autres amines biogènes. Cette intoxication d'origine alimentaire est initialement appelée "Scombrotisme" en raison de la fréquente association avec la consommation de poissons des familles *Scombridae* et *Scomberesocidae* tels que le thon, le

maquereau, la bonite, le tassergal, etc. Ces espèces contiennent des teneurs élevées en histidine libre dans leur muscle qui est décarboxylée en histamine (Lehane et Olley, 2000 ; Taylor, 1986). Plusieurs espèces de poissons non scombridés comme le hareng, la sardine, l'anchois, le saumon rose, le marlin, l'espardon, la sériole, le mahi-mahi, et autres, sont souvent impliquées dans des incidents de Scombrototoxicité dans différents pays tels que le Japon, la Grande-Bretagne, l'Australie, les Etats-Unis et le Taiwan (Lehane et Olley, 2000 ; Taylor, 1986 ; Gessner et al., 1996). Ces espèces contiennent également des teneurs élevées en histidine libre dans leur tissu musculaire.

Cependant, l'histamine ne semble pas être le seul agent causal de Scombrototoxicité. D'autres amines telles que la putrescine et la cadaverine sont également impliquées dans cette maladie car elles renforcent la toxicité de l'histamine (Halász et al., 1994 ; Rice et al., 1976). Les symptômes les plus courants d'intoxication histaminique impliquent le système cardiovasculaire car l'histamine a un effet vasodilatateur, produisant une pression artérielle basse, une rougeur de la peau, des maux de tête, des œdèmes, et des éruptions cutanées et un goût de brûlé ou poivré dans la bouche typique des réactions allergiques, des diarrhées et des crampes abdominales (Bardócz, 1995 ; Lehane et Olley, 2000 ; Taylor, 1986). Ces symptômes disparaissent habituellement en quelques heures sans intervention médicale. Des symptômes plus graves (par exemple, une détresse respiratoire, une enflure de la langue et de la gorge et une vision floue) peuvent survenir et nécessitent un traitement médical à base d'antihistaminiques. Dans de nombreux cas, ces symptômes disparaissent trop rapidement pour les intoxications naturellement associées à la consommation d'aliments contenant des amines biogènes. Dans certains cas, ces intoxications sont souvent confondues avec des allergies alimentaires. Des symptômes identiques se produisent et les antihistaminiques sont également efficaces dans le traitement des deux maladies. Cependant, l'intoxication à l'histamine peut être différenciée d'une réaction allergique à partir de trois critères principaux : le premier critère est que le patient n'avait aucune allergie antérieure à l'aliment en cause ; le deuxième paramètre est la présence d'un taux d'attaque élevé dans les foyers déclarés ; une autre recommandation utilisée pour la différenciation est la présence d'une forte concentration d'histamine dans l'aliment incriminé. Des niveaux élevés d'immunoglobuline E (IgE) chez les personnes atteintes peuvent aussi être utilisés pour différencier les réactions allergiques de l'intoxication aux Scombridés (ten Brink, et al., 1990).

Cependant, la toxicité des amines biogènes dépend de la capacité des individus à métaboliser les apports alimentaires normaux en amines biogènes (Bardócz, 1995 ; Rice et al., 1976). Ce système de désintoxication comprend des enzymes spécifiques comme la monoamine oxydase (MAO), la diamine oxydase (DAO), et la polyamine oxydase (PAO). Ces enzymes transforment l'histamine en métabolites moins toxiques qui sont excrétés dans l'urine et les fèces. Cependant, le système est sensible à certains facteurs de risque impliquant ces enzymes, comme la consommation des produits alimentaires contenant des taux élevés d'amines biogènes (le cas du poisson gâté ou fermenté), l'alcool, les maladies gastro-intestinales, ou dans le cas de la prise de certains médicaments qui peuvent agir comme inhibiteurs de la monoamine oxydase (Ruiz-Capillas et Jiménez-Colmenero, 2009).

La présence d'autres amines peut également contribuer à la toxicité de l'histamine. La phényléthylamine est un inhibiteur connu des enzymes la DAO et l'histamine méthyl-transférase. La putrescine et la cadavérine peuvent inhiber l'enzyme intestinale MAO, favorisant ainsi l'absorption et/ou la réduction du catabolisme de cette amine et améliorant sa toxicité, même lorsque la concentration d'histamine n'est pas si élevée (Bardócz, 1995). Par conséquent, l'effet d'une quantité donnée de l'histamine dans les produits de la pêche dépend de la quantité présente des activateurs et de l'efficacité du système de détoxification de l'individu (Lehane et Olley, 2000). En outre, certaines amines biogènes, essentiellement la putrescine et la cadavérine, peuvent réagir avec les nitrites pour former des composés toxiques ou cancérigènes tels que les nitrosamines ; et cela est beaucoup moins important dans les produits de la pêche que dans les produits carnés (Ruiz-Capillas et Jiménez-Colmenero, 2004).

2.2. Facteurs influant sur la formation d'amines biogènes dans le poisson

La formation des amines biogènes dans les produits de la pêche est causée principalement par la décarboxylation enzymatique microbienne de certains acides aminés libres (AAL). Cette formation est influée par un substrat et une enzyme, ainsi que par des facteurs qui agissent sur ces derniers comme la matière première, les microorganismes, les transformations technologiques et les conditions de stockage qui influent directement l'enzyme, le substrat, et le milieu réactionnel (Ruiz-Capillas et Jiménez-Colmenero, 2009).

2.2.1. Matières premières

Les amines biogènes dans le muscle. La matière première est déterminante pour le niveau et la formation des amines biogènes dans le produit final. Initialement, le muscle de poisson fraîchement pêché contient des concentrations d'amines biogènes, principalement des polyamines (spermidine et spermine et dans certains cas putrescine et agmatine), qui sont caractéristiques de l'espèce de poisson et du type de muscle concerné (Ruiz-Capillas et Moral, 2001a ; Ruiz-Capillas et Moral, 2001b ; Ruiz-Capillas et Moral, 2003). Par exemple dans le cas du thon, les concentrations initiales d'amines biogènes sont généralement plus élevées dans le muscle blanc que dans le muscle rouge, à l'exception de la putrescine, dont les niveaux sont similaires dans les deux types de muscles, et la spermidine, dont les niveaux sont plus élevés dans le muscle rouge que dans le muscle blanc (Ruiz-Capillas et Moral, 2003 ; Du et al., 2002). Wendakoon et al. (1990) ont trouvé des concentrations plus élevées d'amines biogènes dans le muscle rouge que dans le muscle blanc du hareng. L'agmatine n'est trouvée qu'à l'état de traces dans le calmar fraîchement pêché (Paarup et al., 2002a ; Paarup et al., 2002b). Les concentrations les plus élevées d'amines biogènes rapportées dans le merlu cru sont la putrescine et la spermidine avec des niveaux de 3.08 mg/kg et 2.71 mg/kg, respectivement. Alors que les concentrations initiales de l'histamine, la cadaverine et l'agmatine sont très faibles (moins de 1 mg/kg) et les niveaux de tyramine sont inférieurs à 1 mg / kg, ou dans certains cas non détectables dans le merlu (Ruiz-Capillas et Moral, 2001a ; Ruiz-Capillas et Moral, 2001c).

Les acides aminés libres dans le muscle. La matière première de poisson est la source naturelle des AAL à partir de laquelle les amines biogènes sont produites. Les niveaux des AAL dans le poisson sont élevés par rapport aux animaux terrestres car la fonction première de ces composés est de servir comme des osmo-régulateurs dans les organismes aquatiques. Le niveau et le type de ces AAL dépendent du poisson (famille, espèce, etc) et du type de muscle (rouge ou blanc). Les poissons contiennent des proportions variables de muscle rouge et blanc, qui exécutent différentes fonctions physiologiques chez l'animal vivant (Huss, 1999). Les membres des familles *Scombridae* et *Scomberosocidae* contiennent des concentrations plus élevées d'histidine libre (ce qui est décarboxylé en histamine) que d'autres espèces de poissons (Ruiz-Capillas et Moral, 2003 ; Du et al., 2002 ; Ruiz-Capillas et Moral, 2001c ; Mendes et al., 1999). Les deux types de muscles dans le thon contiennent différents niveaux d'histidine, avec des concentrations plus élevées dans le muscle blanc que dans le

muscle rouge (Ruiz-Capillas et Moral, 2003). Dans le cas d'autres AAL précurseurs d'amines biogènes dans le muscle de thon, il n'y a pas de différences significatives dans les concentrations d'AAL entre le muscle blanc et le muscle rouge. Dans le cas de la lysine, par exemple, le muscle rouge contient des concentrations plus élevées que le muscle blanc (Ruiz-Capillas et Moral, 2003). Les différences dans la composition des muscles influent sur les changements chimiques qui ont lieu pendant le stockage, et par conséquent dans la formation d'amines biogènes (Ruiz-Capillas et Moral, 2003 ; Ochiai et al., 1990). Les AAL en général sont formées dans le poisson à la suite de protéolyse musculaire. Une diminution de la concentration des AAL est également associée à une consommation plus importante de ces acides aminés par les micro-organismes qui les utilisent comme substrat de croissance (Huss, 1999), ce qui donne naissance à une variété de composés notamment les amines biogènes (Ruiz-Capillas et Moral, 2003 ; Ochiai et al., 1990). Une diminution des teneurs initiales en acides aminés libres est généralement observée au cours du stockage du poisson. Ruiz-Capillas et morale (2003) ont observé que les concentrations d'histidine sont diminuées de manière significative dans le muscle blanc, mais sont restées stables dans le muscle rouge. Une corrélation est observée entre l'acide aminé histidine et l'amine biogène histamine, pendant le stockage du thon, mais seulement dans le muscle blanc.

Muscle en tant que milieu réactionnel. Le muscle est aussi le milieu dans lequel la décarboxylation se déroule et il est donc nécessaire de déterminer le facteur essentiel pour l'activité enzymatique comme le pH, la force ionique, la concentration de substrat, les inhibiteurs, etc (Ruiz-Capillas et Jiménez-Colmenero, 2004). Le pH du muscle de sardine relativement faible favorise éventuellement la décarboxylation de l'histidine (Ababouch et al., 1996).

2.2.2. Microorganismes

Les amines biogènes sont principalement produites par la décarboxylation enzymatique microbienne de certains acides aminés libres (Halász et al., 1994 ; Silla, 1996). Il est important d'identifier les bactéries qui possèdent une activité de décarboxylation des acides aminés afin d'estimer le risque de production d'amines biogènes et d'empêcher l'accumulation de ces dernières dans les produits de la pêche. Plusieurs bactéries Gram positif et Gram négatif sont impliquées dans la formation des amines biogènes.

Dans le cas de poisson, les bactéries de décarboxylation les plus étudiées sont celles qui sont impliquées dans la formation d'histamine en raison de leur implication dans les intoxications d'origine alimentaire. Les enzymes de décarboxylation d'histamine sont généralement trouvées dans les bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* ainsi que dans les genres de *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Vibrio*, et *Photobacterium* sp. (Paarup et al., 2002a ; Emborg et al., 2002 ; Auerswald et al., 2006 ; Paarup et al., 2002b ; Silla, 1996). *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Staphylococcus* et *Bacillus* sp. ont également été signalées comme ayant le potentiel de produire l'histamine par l'activité de décarboxylation (Middlebrooks et al., 1988 ; Rodriguez-Jerez et al., 1994).

La variation observée dans la capacité de décarboxylation des différentes espèces est extrêmement large. Les différences dans la capacité de produire les amines biogènes sont même observées entre les souches de la même espèce. *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Raoultella planticola*, *Raoultella ornithinolytica* et *Clostridium perfringens* ont été toutes identifiées en tant que fortes productrices d'histamine dans le poisson produisant plus de 1000 ppm, toujours en fonction des conditions de stockage, en particulier la température. Les souches de *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii* et *Escherichia coli* sont des faibles productrices d'histamine, produisant des niveaux moins de 500 ppm (Kim et al., 2001 ; Kim et al., 2004). De plus, *Vibrio alginolyticus* et *Alteromonas putrefaciens* ont également été isolées à partir de mahi-mahi et déterminées en tant que faibles productrices d'histamine, produisant moins de 100 ppm (Frank et al., 1985). Parmi eux, *M. morganii*, *K. pneumonie* et *H. alvei* sont souvent les plus impliquées dans les foyers d'intoxications aux Scombridés (Kim et al., 2004 ; Taylor, 1986).

La *Photobacterium* sp., un organisme psychrophile, a été proposée comme étant une importante histamino-productrice (ten Brink et al., 1990). La *Photobacterium phosphoreum* est également capable de produire l'agmatine et la cadaverine (Paarup et al., 2002b ; Okuzumi et al., 1994). *Morganella psychrotolerans*, une nouvelle bactérie psychrotolérante, a été identifiée par Emborg et al. (2006) en tant que forte productrice d'histamine. Kanki et al. (2004) suggèrent que la formation d'histamine par les bactéries psychrotolérantes cause une partie importante des incidents signalés de l'intoxication à l'histamine.

La capacité de former l'histamine dans les aliments fermentés semble être limitée aux quelques souches de lactobacilles, notamment *Lactobacillus* 30a, *L. buchneri* et *L. delbrueckii* (Taylor, 1986). La formation de l'histamine dans les produits fermentés tels que les sauces de poisson est produite par des bactéries lactiques à Gram positif (LAB). L'activité de la tyrosine

décarboxylase est plus fréquente chez les bactéries à Gram positif (Bover-Cid et Holzapfel, 1999). Thapa et al. (2006) ont montré que les bactéries lactiques isolées à partir de produits de la pêche transformés traditionnellement en provenance de l'Himalaya oriental ne produisent pas d'amines biogènes. Cependant, d'autres auteurs ont identifié LAB comme responsables de la production de certaines amines biogènes dans du calmar conservé sous glace et dans le saumon fumé à froid (Paarup et al., 2002b ; Jorgensen et al., 2000a).

Les micro-organismes formant amines peuvent constituer une partie de la microflore endogène associée à la microflore du poisson ou peuvent être introduits par la contamination pendant le traitement et le stockage de poisson. Chez le poisson fraîchement pêché, la contamination bactérienne se trouve d'abord sur la peau et les branchies; à partir de là, ces micro-organismes envahissent la chair du poisson et se développent rapidement en réponse avec certains nombres de facteurs liés à la transformation et les conditions de stockage telles que la température et le temps, etc (Ruiz-Capillas et Jiménez-Colmenero, 2009).

2.2.3. Traitement et conditions d'entreposage des produits de la pêche

En général, les niveaux d'amines biogènes augmentent pendant le traitement et le stockage des produits de la pêche, et cette augmentation dépend de nombreux facteurs liés aux conditions de traitement et de stockage. Ces facteurs influent sur les principaux éléments impliqués dans la formation des amines biogènes, telles que les AAL ou les enzymes de décarboxylation microbienne. Afin de limiter la formation des amines biogènes dans les produits de la pêche, il ne suffit pas d'avoir une matière première convenable, il est également nécessaire d'optimiser les conditions de traitement et de stockage (Ruiz-Capillas et Jiménez-Colmenero, 2009).

Manipulation. La manipulation du poisson est décisive pour la formation des amines biogènes, et le résultat dépend évidemment du type de poisson (Mendes et al., 1999 ; Haaland et al., 1990 ; Fernández-Salguero et Mackei, 1987). Haaland et al. (1990) ont rapporté que la formation de cadavérine et de putrescine est plus élevée dans le maquereau non vidé que dans les filets pendant le stockage. Fernández-Salguero et Mackei (1987) ont également rapporté que l'histamine, la cadavérine et la putrescine sont produites plus rapidement dans les filets d'aiglefin que dans le poisson entier et éviscéré, alors que le poisson non éviscéré s'altère plus rapidement que les filets.

Réfrigération. Le temps et la température de stockage sont les facteurs déterminants dans la production des amines biogènes. Ces facteurs influent sur la croissance de micro-organismes et donc sur la production des enzymes de décarboxylation des acides aminés nécessaires à la production des amines biogènes. En général, les niveaux d'amines biogènes, à l'exception des polyamines (la spermidine et la spermine qui restent généralement constantes), augmentent progressivement au cours du stockage de poisson dans la glace. L'augmentation est plus faible si le poisson avait été refroidi de manière efficace dans la glace à 0–2 °C (Wendakoon et al., 1990 ; Watanabe et al., 1992). Le comportement dans chaque cas dépend de l'espèce de poisson et du type de muscle. Dans le cas du thon, les augmentations marquées de l'histamine sont enregistrées entre 18–25 jours dans le muscle blanc, mais seulement au dernier jour de stockage dans le muscle rouge. Dans le cas de cadaverine et d'agmatine, les changements se produisent à nouveau mais plus tard dans le muscle rouge que dans le muscle blanc (Ruiz-Capillas et Moral, 2003). D'autres auteurs (Paarup et al., 2002a ; Yamanaka et al., 1987) ont également observé que l'agmatine est l'amine biogène avec la plus grande concentration dans le calmar conservé sous glace. Dans les poissons maigres de haute qualité comme le sébaste, l'églefin, la plie et le merlu conservés sous glace à 0–4 °C, les niveaux d'amines biogènes (histamine, putrescine, cadavérine et tyramine) sont restés inférieurs à 10 mg/kg. Cependant, les concentrations d'amines biogènes s'augmentent lorsque la durée de stockage est prolongée. Dans le merlu maintenue à 0–2 °C pendant 33 jours, la cadavérine atteint la concentration la plus élevée (72.14 mg/kg) à la fin de stockage par rapport à 13.47 mg/kg d'agmatine et 7.12 mg/kg de putrescine, et même avec les niveaux d'histamine et de tyramine qui ont moins de 3.5 mg/kg (Ruiz-Capillas et Moral, 2001a). Ces faibles taux d'amines biogènes sont le résultat d'une très faible croissance microbienne et d'une faible décarboxylation enzymatique à basse température de stockage (Huss, 1999).

L'augmentation de la température lors du stockage a également été étudiée comme un facteur dans la formation des amines biogènes. Frank et al. (1985) ont rapporté que la formation des amines biogènes est étroitement liée à l'activité des bactéries mésophiles que psychrophiles, ce qui pourrait expliquer le fait que la formation de ces amines était plus grande à 20 °C. Klausen et Huss (1987) ont rapporté que *M. morgani* pousse bien à 15 °C ou plus, et que la croissance est considérablement réduite au-dessous de 10 °C. Ces auteurs ont confirmé que *M. morgani* pourrait produire de grandes quantités d'histamine (600-1400

mg/kg) dans les maquereaux stockés à basse température (0 à 5 °C) suivant le stockage à des températures élevées (10 à 25 °C).

Cependant, *Vibrio* et *Photobacterium* sp. sont probablement les principaux responsables de la production de l'histamine à basses températures (Emborg et al., 2002, Rodriguez-Jerez et al., 1994, Dalgaard et al., 1997) sachant que la température optimale de ces bactéries est inférieure à 10 °C. Ababouch et al. (1996) ont montré que le taux de formation de l'histamine dans la sardine est supérieur à la température ambiante qu'au stockage sous glace. Après 24 h de stockage à la température ambiante, l'histamine, la cadavérine et la putrescine ont atteint des niveaux de 2350, 1050 et 300 mg/kg, respectivement. Des résultats similaires ont été rapportés par d'autres auteurs dans différentes espèces de poissons. Veciana-Nogués et al. (1997) ont montré des profils similaires pour l'évolution des amines biogènes dans le thon à trois températures de stockage (0, 8 et 20 °C). Les niveaux des polyamines (la spermidine et la spermine) restent généralement constants au cours du stockage et indépendants de la température parce que la formation de ces amines est à peine affectée par l'altération de poisson (Veciana-Nogués et al., 1997 ; Ruiz-Capillas et Moral, 2001a).

D'autre part, la diminution de l'histamine pendant l'altération avancée de poisson a été signalée en association avec la croissance de micro-organismes présentant une activité histaminolytic (Taylor, 1986 ; Veciana-Nogués et al., 1997 ; Ababouch et al., 1996). Veciana-Nogués et al. (1997) ont rapporté des diminutions considérables de l'histamine et de la cadaverine après 3 jours de stockage à 20 °C, où l'altération était bien avancée, alors qu'aucune diminution de l'histamine, de putrescine, de cadavérine et de tyramine n'est observée lorsque les échantillons sont conservés à 0 et 8 °C. Ababouch et al. (1996) ont observé que pendant de longues périodes de stockage de sardine à la température ambiante (plus de 24 h), les niveaux d'histamine ont commencé à diminuer, ce qui indique la prolifération de bactéries présentant l'activité de l'histaminase. Par conséquent, le moyen le plus efficace pour prévenir la formation des amines biogènes dans le poisson est de le maintenir à basse température tout au long du traitement et du stockage. Il est communément admis que le stockage au niveau proche ou égal à 0 °C limite la formation des amines en retardant considérablement la croissance bactérienne et l'activité des enzymes de décarboxylation (Huss, 1999).

En général, la congélation n'affecte pas la croissance microbienne ou l'activité enzymatique et donc n'affecte pas la production des amines biogènes. Cependant, certains auteurs (Mendes et al., 1999) ont isolé des bactéries productrices d'histamine à partir de poisson congelé. La présence d'amines dans le poisson surgelé est indicative des caractéristiques de la matière première avant la décongélation (Huss, 1999).

Conserves. Les amines biogènes sont stables au traitement thermique, et donc la présence des amines biogènes dans les produits en conserve indique que le poisson a subi une altération microbienne avant le chauffage (Huss, 1999 ; Shalaby, 1996). Fernández-Salguero et Mackie (1987) ont rapporté des niveaux très faibles (moins de 2 mg/kg) d'amines biogènes dans les conserves de thon, de maquereau et de sardine.

Fermentation. Les produits de poisson fermentés sont particulièrement riches en histamine, suivie de la phényléthylamine (Fardiaz et Markakis, 1979). Les étapes de fermentation sont parfois effectuées sans contrôle adéquat de la température. Des températures de fermentation élevées augmentent les concentrations des amines biogènes, notamment l'histamine. Une augmentation considérable de la putrescine, l'histamine et la tyramine dans les sardines fermentées est associée à une augmentation de concentration des bactéries histaminogènes halotolérantes et halophiles (*Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Vibrio*, et *Pseudomonas*).

Le salage. Les teneurs en amines biogènes dans le poisson salé varient généralement beaucoup (Lee et al., 2005). La concentration moyenne de chaque amine dans le maquereau salé vendu sur les marchés de détail et les supermarchés de Taïwan est moins de 3 mg/100 g (Tsai et al., 2005). Des niveaux plus élevés d'histamine sont également détectés dans quelques échantillons de maquereau testés, alors que des quantités infimes de spermidine, phényléthylamine, agmatine et spermine ont été enregistrées. Rodríguez-Jerez et al. (1994) ont évalué l'activité de l'histidine décarboxylase des bactéries isolées à partir de mûries semi-conserves de l'anchois espagnol. Ils ont trouvé des niveaux plus élevés de l'activité de l'histidine décarboxylase dans la *M. morgani*, qui est également une productrice de putrescine et de cadavérine. D'autres espèces telles que *S. epidermidis*, *S. xylosum*, *K. oxytoca*, *E. cloacae*, *Pseudomonas cepaciae* et *Bacillus* sp. ont également été impliquées dans la production de ces amines biogènes. D'autres auteurs ont identifié *Staphylococcus* sp., *Vibrio* sp., et *Pseudomonas* III / IV-NH halotolérantes comme étant des productrices d'histamine

dans le poisson salé (Yatsunami et Echigo, 1993; Rodríguez-Jerez et al., 1994). Tsai et al. (2005) ont également identifié *Pantoea* sp., *P. agglomerans*, et *E. cloacae* comme étant des productrices d'histamine dans le maquereau salé.

Fumage. Les amines biogènes sont également étudiées dans le poisson fumé. Le processus de fumage commence habituellement avec une phase de séchage. Cette phase devrait être courte, car une exposition prolongée à la température ambiante peut conduire à une croissance microbienne non désirée et à la formation d'histamine chez les espèces sensibles. Shalaby (1996) a observé des niveaux de putrescine, cadavérine et spermine entre 1-16 mg/kg et de faibles niveaux de tyramine, spermidine, et histamine (1-8 mg/kg) dans le hareng fumé. La tryptamine et la phényléthylamine n'ont été détectées dans aucun des échantillons analysés.

Atmosphères protectrices. En règle générale, l'application des atmosphères protectrices réduit la formation des amines biogènes sauf la spermidine et la spermine. Cet effet est dû principalement au mélange de gaz utilisé dans l'atmosphère qui agit sur la croissance microbienne et donc sur les enzymes de décarboxylation des acides aminés. L'effet de cette technologie dépend aussi du type de l'atmosphère utilisée (contrôlée, modifiée, etc), du type d'amine biogène et de l'espèce de poisson (Emborg et al., 2002 ; Ruiz-Capillas et Morale, 2003 ; Ruiz-Capillas et Morale, 2001c ; Emborg et al., 2005). Ruiz-Capillas et Morale (2003) ont montré qu'une atmosphère contrôlée avec un mélange gazeux contenant une forte concentration de CO₂ est la plus efficace pour réduire les amines biogènes dans le thon obèse. Cependant, le niveau élevé de CO₂ (60%) dans l'atmosphère contrôlée n'est pas suffisant pour inhiber la production des amines biogènes dans le merlu vidé et réfrigéré, tandis que la concentration élevée en O₂ (40%) dans l'atmosphère contrôlée a un effet inhibiteur sur la production des amines biogènes dans le merlu (Ruiz-Capillas et Morale, 2001b). La combinaison de différentes atmosphères protectrices est également efficace dans la réduction des niveaux d'amines biogènes. Les merlus en vrac stockés dans une atmosphère contrôlée (40% de CO₂ ; 40% O₂ ; 20% N₂) pour les 12 premiers jours, puis emballés dans des barquettes sous atmosphères modifiées avec le même mélange de gaz montrent aussi des niveaux inférieurs d'amines biogènes au cours du stockage, à l'exception de l'agmatine (Ruiz-Capillas et Morale, 2001c). Cependant, ces atmosphères protectrices ne sont efficaces que si le produit est maintenu dans le stockage réfrigéré. Une combinaison appropriée de basse température et d'atmosphère, puis, les potentiels de l'effet inhibiteur de CO₂, retardant la

croissance des micro-organismes d'altération dans ce poisson (Ruiz-Capillas et Moral, 2001b ; Emborg et al., 2002 ; Emborg et al., 2005). Emborg et al. (2002) ont montré que l'altération de morue emballée sous atmosphère modifiée (MAP) est causée par la croissance et le métabolisme de la bactérie *Photobacterium phosphoreum* CO₂-résistantes. Cet organisme spécifique d'altération pousse à des niveaux élevés dans les différents poissons emballés sous MAP, mais il est inactivé par la congélation à -20 °C (Dalgaard et al., 1997). Jorgensen et al. (2000b) ont également constaté que *P. phosphoreum* est le principale responsable de la production des amines biogènes dans le saumon fumé à froid et emballé sous vide, où l'agmatine, la cadaverine, l'histamine et la tyramine sont formées à 5 °C.

Traitement à haute pression. Très peu d'études ont été réalisées sur l'effet du traitement à haute pression sur la formation et l'évolution des amines biogènes dans les produits de la pêche. Paarup et al. (2002b) ont observé que le début de formation de l'agmatine et des autres amines biogènes est retardé par l'augmentation de la pression dans le calmar emballé sous vide. L'application de pressions modérées (150 à 200 MPa) réduit le taux de formation de l'agmatine, tandis que des pressions plus élevées (300 à 400 MPa) retardent le début de la production de cette amine. La pressurisation à 400 MPa inhibe la formation de l'histamine et maintient une faible formation de putrescine, tandis que des concentrations plus élevées de tyramine sont détectées dans le calmar pressurisé à 300 et 400 MPa. Fujii et al. (1994) ont également rapporté l'absence de l'histamine dans la chair de maquereau haché et pressurisé à 200 MPa pendant l'entreposage frigorifique. Paarup et al., 2002b ont observé que *P. phosphoreum* est responsable de la production des amines biogènes, surtout l'agmatine et l'histamine, dans le calmar pressurisé, tandis que *Carnobacterium* sp. est identifiée comme responsable de la production de tyramine.

Irradiation. L'effet d'irradiation sur la formation des amines biogènes a été étudié par Mendes et al. (2005) dans le chinchard pendant l'entreposage frigorifique. Ils ont noté que l'histamine est indétectable (même à 1 kg) dans le chinchard irradié à la fin de stockage (23 jours) lorsque le poisson est décomposé. Cet effet est associé à une majorité des bactéries anaérobies à Gram négatif, puisque environ 10–18% sont des bactéries à Gram positif dans les échantillons irradiés.

2.3. Amines biogènes comme indice de qualité des produits de la pêche

Bien que le contrôle des amines biogènes dans les produits de la pêche ait été souvent entrepris en raison de leur implication dans les intoxications alimentaires (Bardócz, 1995 ; Taylor, 1986), la détermination de ces amines est également proposée comme un indice de qualité pour détecter l'altération du poisson et/ou les préparations défectueuses. Les amines biogènes sont utilisées comme indice de contrôle de qualité car ils subissent des changements au cours du traitement et du stockage de poisson. Elles se trouvent à des niveaux très faibles dans le poisson frais; mais leur formation a tendance à augmenter au cours du stockage où elles sont généralement associées à une altération bactérienne (Halász et al., 1994 ; Paarup et al., 2002a ; Emborg et al., 2002).

Mietz et Karmas (1978) ont proposé un indice chimique de qualité pour déterminer le niveau d'altération de thon frais avant la mise en conserve. La relation de cinq amines (histamine, putrescine, cadavérine, spermine et spermidine) dans le poisson en conserve est quantifiée et calculée sur une partie par million de base (ppm) afin d'être utilisé comme un indice d'altération de thon:

$$\text{Index: } \frac{\text{Histamine (ppm)} + \text{Putrescine (ppm)} + \text{Cadaverine (ppm)}}{1 + \text{Spermine (ppm)} + \text{Spermidine (ppm)}}$$

La limite d'acceptabilité du poisson pour cet indice de qualité est fixée à 10. Plus tard, d'autres auteurs (Veciana-Nogues et al., 1997) ont proposé un indice calculé à partir de la somme des teneurs en histamine, tyramine, cadaverine et putrescine, qui a montré de bonnes corrélations avec le temps du stockage et l'évaluation organoleptique du thon.

D'autres amines biogènes individuelles comme l'agmatine et la cadaverine sont utilisées comme des indicateurs de fraîcheur du poisson, ce qui reflète les changements qui se produisent dans le poisson au début du stockage et avant l'appréciation de l'altération microbienne (Ruiz-Capillas et Moral, 2001a ; Yamanaka et al., 1987 ; Paarup et al., 2002a). Ces deux amines sont associées à des changements autolytiques responsables de la perte de fraîcheur qui se déroulent dans le muscle de poisson avant le début de l'altération microbienne. Certains auteurs suggèrent que cela soit défini comme le début de la formation de quelques amines biogènes et d'autres composés d'altération comme l'ABVT ou la

triméthylamine azote, qui sont habituellement utilisés comme indices pour évaluer l'altération du poisson réfrigéré.

L'évaluation de la qualité par les amines biogènes a également été étudiée par Mendes (1999), qui a signalé des changements dans la teneur de l'histamine, la cadaverine, la putrescine et l'agmatine dans la sardine (*Sardina pilchardus*), le chinchard (*Trachurus trachurus*), le maquereau (*Scomber japonicus*) et le maquereau de l'Atlantique (*Scomber scombrus*) lors du stockage à la température ambiante (20-23 °C) et sous glace (2-3 °C). La formation de l'histamine et des autres amines variait énormément avec l'espèce de poisson et les conditions de stockage. Quelle que soit la température de stockage, les niveaux d'histamine, de putrescine et de cadaverine augmentent progressivement au cours de l'altération chez toutes les espèces de poissons pour atteindre des limites maximales pour la consommation humaine après 24 h de stockage à la température ambiante. En revanche, la production des amines dans le poisson conservé sous glace est considérablement réduite et la concentration de l'histamine augmente lentement jusqu'au 7^{ème} jour, après quoi une augmentation considérable est observée mais généralement en dessous de 100 mg/kg. Mietz et Karmas (1978) ont également constaté que la teneur en histamine varie beaucoup avec les espèces de poissons et ces auteurs ne recommandent pas son utilisation pour évaluer la qualité de la chair du poisson. La même constatation a été confirmée par Mendes (1999) qui a examiné la formation de l'histamine dans la sardine et le maquereau où aucune corrélation n'est trouvée entre la production de l'histamine et la qualité organoleptique du poisson.

Les amines biogènes sont également utilisées comme un indice de qualité pour les produits du poisson traités avec d'autres technologies telles que les atmosphères protectrices (sous vide, sous atmosphère modifiée). La cadaverine et l'agmatine sont proposées comme un indice de contrôle du merlu éviscéré, réfrigéré et stocké dans des atmosphères contrôlées (Ruiz-Capillas et Moral, 2001b). Krizek et al. (2004) ont suivi les changements de qualité de la chair de carpe (*Cyprinus carpio*) en présence/absence de l'emballage sous vide pendant le stockage à différentes températures (3 et 15 °C). L'évaluation sensorielle, chimique et microbienne a été étudiée pendant toute la durée de stockage afin de déterminer les effets de la température et du type d'emballage sur la qualité du carpe. Sept amines biogènes (putrescine, cadaverine, spermidine, spermine, histamine, tyramine et tryptamine) sont déterminées, et la basse température a un effet remarquable résultant en une faible teneur en amines biogènes et une meilleure qualité des échantillons testés.

Concernant les conserves de poisson, les amines biogènes peuvent être utiles en tant qu'indicateurs de mauvaise qualité des matières premières car elles sont des composés thermostables (Huss, 1999). Une bonne corrélation a été trouvée entre l'analyse sensorielle et les niveaux de putrescine et de cadaverine dans la bonite en conserve (Sims et al., 1992). Jorgensen et al. (2000b) ont constaté que les amines biogènes sont en bonne corrélation avec l'analyse sensorielle dans le saumon fumé à froid, mais ils pensaient que les amines biogènes ne sont pas nécessairement les agents responsables de l'altération des saveurs.

2.4. Limites légales d'amines biogènes dans les produits de la pêche

2.4.1. Limites critiques pour les concentrations d'histamine dans les produits de la pêche

En raison de la récurrence de l'intoxication histaminique comme un problème mondial et en raison de l'importance du commerce international des espèces de poissons en cause, de nombreux pays ont établi des limites maximales ou des lignes directrices sur les concentrations d'histamine dans les poissons commercialisés. L'Union Européenne exige que neuf échantillons doivent être analysés à partir de chaque lot de poissons associés à une grande quantité d'histamine, en particulier les espèces de familles suivantes: *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryphaenidae*, *Pomatomidae* et *Scomberesocidae* (EEC, 2005).

La teneur en histamine dans les échantillons doit répondre aux exigences suivantes pour obtenir des échantillons acceptables à la consommation humaine:

- la teneur moyenne ne doit pas dépasser 10 mg/100 g
- deux échantillons peuvent avoir une valeur supérieure à 10 mg/100 g, mais inférieure à 20 mg/100 g
- aucun échantillon ne peut présenter une valeur supérieure à 20 mg/100 g.

Dans les produits de la pêche qui ont subi un traitement de maturation enzymatique en saumure et fabriqués à partir d'espèces des familles mentionnées ci-dessus, les valeurs limites d'histamine sont portées à 20 et 40 mg/100 g, respectivement. Dans d'autres pays comme l'Australie, la Nouvelle-Zélande et le Brésil, le niveau d'histamine ne doit pas dépasser 10 mg/100 g dans un échantillon de poisson.

En ce qui concerne la FDA (Food and Drug Administration) américaine, des lignes directrices spécifient le niveau de toxicité à 50 mg/100 g et le niveau de contrôle des défauts à 5 mg/100 g, parce que l'histamine n'est pas répartie uniformément dans un poisson altéré. Donc, si 5 mg/100 g est détecté dans une section du poisson, il est possible que d'autres sections puissent dépasser 50 mg/100 g. Dix-huit poissons par lot doivent être analysés individuellement ou en composites (par exemple, 6 unités de chaque poisson), et par conséquent le seuil critique est réduit de 50 mg/kg à 17 mg/kg. La réglementation s'applique à de nombreuses espèces de poissons, y compris l'escolar, l'oilfish et les marlins mais pas l'orphie, les voiliers et l'espadon (FDA, 2001).

2.4.2. Température de stockage

La réglementation de l'Union Européenne (CE 853/2004) exige que « les produits de la pêche frais, les produits de la pêche non transformés et les produits cuits et réfrigérés, les crustacés et les mollusques doivent être maintenus à une température proche à celle de la glace fondante » (EEC, 2004). En ce qui concerne l'inspection pratique de produits de la pêche, ceci est interprété comme une température comprise entre 0 et +2 °C et qui est également applicable aux navires de pêche, mais le temps nécessaire pour atteindre cette température n'est pas spécifié. Les produits de la pêche légèrement conservés avec moins de 6% de sel et le pH supérieur à 5 (par exemple, les produits fumés et les produits GRAVAD) doivent être maintenus à une température inférieure ou égale à 5 °C.

Les règlements aux Etats-Unis sont plus détaillés mais permettent au poisson frais à être conservé à des températures plus élevées. Ainsi, il est recommandé pour le poisson frais (non congelés précédemment) que «le poisson doit être placé dans la glace ou dans l'eau de mer réfrigérée ou dans la saumure à une température inférieure ou égale à 4.4 °C dans les 12 heures post-mortem, ou placé dans l'eau de mer réfrigérée ou dans la saumure à une température inférieure 10 °C dans les 9 heures post-mortem ». En outre, « le poisson exposé à des températures de l'air ou de l'eau au-dessus de 28.3 °C ou les grands thons (par exemple au-dessus de 9.1 kg) qui sont éviscérés avant à bord du refroidissement, doivent être placés sous glace (y compris le remplissage de la cavité ventrale du gros thon avec de la glace) ou dans l'eau de mer réfrigérée ou dans la saumure à une température inférieure ou égale à 4.4 °C dans les 6 heures post-mortem ».

« Les grands thons qui ne sont pas éviscérés d'avance à bord du refroidissement doivent être réfrigérés à une température interne inférieure ou égale 10 °C dans les 6 heures post-mortem ». De plus, le poisson frais « ne doit pas être exposé à des températures supérieures à 4.4 °C pour une durée supérieure à 4 heures, cumulativement, si aucune partie de ce temps est à une température supérieure à 21 °C ; ou le poisson ne doit pas être exposé à des températures ambiantes supérieures à 4.4 °C pour une durée supérieure à 8 heures, cumulativement, tant qu'aucune partie de ce temps n'est à une température supérieure à 21 °C après la réfrigération à bord du navire de récolte ». Enfin, il est mentionné que plus le froid atteint le point de congélation plus ceci est souhaitable pour protéger contre le développement de l'histamine à long terme (FDA, 2001).

2.5. Détermination des amines biogènes dans le poisson

Vu l'importance considérable des amines biogènes (législative, toxicologique et de qualité) dans les produits de la pêche, il est indispensable de disposer de méthodes analytiques précises. Les amines biogènes dans les différents aliments, y compris le poisson et ses produits de transformation, sont déterminées traditionnellement au moyen de techniques chromatographiques classiques comme la chromatographie sur couche mince, la chromatographie en phase gazeuse, l'électrophorèse capillaire, l'analyse par injection de flux, et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Teti et al., 2002 ; Önal, 2007). La confirmation positive au moyen de spectrométrie de masse après la séparation par l'HPLC (Gosetti et al., 2007) ou par la chromatographie en phase gazeuse (Awan et al., 2008) a été également rapportée pour d'autres denrées alimentaires. De plus, des biocapteurs ampérométriques à base de l'enzyme "histamine oxydase" sont développés pour la détermination de l'histamine (Draisici et al., 1998).

La détermination des amines biogènes à partir de matrice de poisson présente souvent des problèmes pour une variété de raisons car ce type de matrice est très complexe, contenant des niveaux élevés de protéines et une grande variété de matières grasses (0.5% -30%). Pour ces raisons, la plupart des méthodes de détermination des amines biogènes impliquent souvent des étapes préliminaires pour extraire ces composés à partir de matrice de poisson ainsi que des séparations ultérieures et des étapes de quantification (Ruiz-Capillas et Jiménez-Colmenero, 2009).

2.5.1. Processus d'extraction

La préparation des échantillons, ou l'extraction des amines biogènes à partir de poisson, est une étape cruciale dans l'analyse. Des différents solvants sont utilisés pour extraire les amines biogènes à partir de poisson et ses produits de transformation, y compris l'acide chlorhydrique, l'acide trichloracétique (TCA), l'acide perchlorique (PCA) et d'autres solvants organiques tels que le méthanol, le dichlorométhane, l'acétone et l'acétonitrile (Lapa-Guimaraes et Pickova, 2004 ; Moret et Conte, 1996). Parmi ces solvants, le PCA et le TCA sont les plus couramment utilisés en raison de leur effet sur la précipitation des protéines de la matrice de poisson. L'extraction implique souvent une première étape où 5-15 g de chair de poisson sont homogénéisés avec 10-50 ml d'acides à des concentrations différentes (5%, 6% et 7.5%), ensuite ce broyat est centrifugé et filtré (Ruiz-Capillas et Moral, 2001a ; Veciana-Nogues et al., 1997). Le précipité est lavé avec un supplément d'acide, centrifugé et filtré à nouveau. L'extrait d'acide à base de TCA peut également être utilisé pour d'autres analyses chimiques telles que la détermination de la triméthylamine, l'ABVT, l'ammoniac, l'urée et certains AGL (Ruiz-Capillas et Moral, 2001a ; Ruiz-Capillas et Horner, 1999). Dans certains cas, cette première étape dans la détermination des amines biogènes peut inclure une purification ou un nettoyage de l'extrait final basé sur des résines échangeuses d'ions et une phase solide, et généralement l'HLPC dispose d'une petite colonne de nettoyage par échange d'ions qui est mis en place en ligne avant la colonne de séparation (Ruiz-Capillas et Moral, 2001a ; Tracy et al., 1995).

2.5.2. Processus de détermination

Parmi les méthodes disponibles pour la séparation et la quantification des amines biogènes, les techniques chromatographiques sont les plus utilisées pour la détermination de ces composés dans les produits de la pêche, notamment l'HPLC avec une colonne d'échange d'ions ou une colonne en phase inverse. En plus de la simplicité du traitement des échantillons, cette procédure offre une haute résolution, une meilleure sensibilité ainsi qu'une polyvalence dans l'analyse. Il est bien connu que les amines biogènes réagissent mal aux systèmes de détection en raison de la faible volatilité et du manque de chromophores. En outre, beaucoup d'amines biogènes produites dans les aliments ne présentent aucune absorption satisfaisante ni des propriétés de fluorescence importantes. Pour ces raisons, une dérivatisation chimique est nécessaire pour augmenter leur sensibilité, et le marquage

covalent avec des chromophores ou des fluorophores améliore considérablement la sensibilité et la limite de détection par l'UV-VIS ou par la fluorescence (Önal, 2007).

Il y a beaucoup de réactifs de dérivation connus, parmi eux, le chlorure de dansyle et de dansyle, le chlorure de benzoyle, la fluorescéine, le 9-fluorénylméthyle chloroformiate, le *o*-phthalaldéhyde (OPA) et le naphthalène-2,3-dicarboxaldéhyde (Önal, 2007). Parmi ceux-ci, l'OPA et le chlorure de dansyl sont les plus couramment utilisés. Le chlorure de dansyl forme des composés stables après la réaction avec les deux groupes amines (primaire et secondaire), et ces composés sont plus stables que ceux formés à l'aide de l'OPA. Le réactif OPA réagit rapidement avec les amines primaires en présence d'un agent réducteur tel que la N-acétylcystéine, le 2-mercaptoéthanol, ou la thiofluor.

Dans des conditions basiques ($\text{pH} > 9$) et à la température ambiante, la réaction est généralement terminée en 1-30 secondes. Les produits de cette réaction présentent une excitation optimale à 330 nm et une émission maximale à 465 nm (Ruiz-Capillas et Moral, 2001a ; Tracy et al., 1995). En outre, l'OPA est plus rapide et beaucoup plus simple pour des fins de prétraitement de l'échantillon, qui peut être entièrement automatisé en utilisant un échantillonneur automatique plus sensible car la détection par fluorescence est utilisée plutôt que la détection par spectrophotométrie comme dans le cas du chlorure de dansyl (Tracy et al., 1995). D'autre part, le dérivé OPA est instable et l'intensité de fluorescence diminue rapidement surtout en milieu alcalin. Ce problème nécessite un contrôle strict des temps de réactions, mais il peut être résolu en utilisant la dérivation post-colonne ou pré-colonne automatique.

La dérivation des amines biogènes peut être effectuée avant (pré-colonne), pendant (en colonne) ou après (post-colonne) la séparation chromatographique (Önal, 2007 ; Gosetti et al., 2007). La dérivation automatique en ligne post-colonne est la procédure la plus courante car elle offre de nombreux avantages : elle implique moins de manipulation et réduit la probabilité d'interférences ou d'artefacts de l'échantillon. Le temps d'analyse est plus court et la dérivation se produit en même temps en améliorant ainsi la reproductibilité et la sensibilité de l'analyse (Tracy et al., 1995). Cependant, la pré-dérivation implique plusieurs étapes de préparation de l'échantillon, ce qui peut entraîner des problèmes dans l'analyse par la suite. En outre, la post-dérivation est habituellement réalisée avec un étalon interne. Elle implique la comparaison avec un étalon externe composé de différentes amines

biogènes. Le chlorure de dansyl est normalement utilisé pour une dérivation pré-colonne avec une séparation en phase inverse couplée à une détection UV (Lopez-Galvez et al., 1995), tandis que les OPA sont utilisés pour une dérivation post et pré-colonne avec une séparation en phase inverse par paires d'ions couplés à une détection par fluorescence (Ruiz-Capillas et Moral, 2001a ; Veciana-Nogues et al., 1997 ; Tracy et al., 1995).

L'analyse par injection en flux (FIA) est une nouvelle méthode, rapide et simple avec de faibles coûts d'exploitation pour la détermination des amines biogènes dans les produits de la pêche. La FIA couplée avec la dérivation automatique d'OPA a été utilisée pour la détermination de l'histamine dans le thon en conserve (Gutierrez et al., 1987 ; Hungerford et al., 2001). Dans la méthode FIA, tous les réactifs sont ajoutés automatiquement. Les débits et les volumes de réactif OPA offrent le pH et le temps nécessaires pour la réaction. Ce système utilise trois canaux et une colonne d'échange d'anions pour éliminer les interférences dans la matrice de l'échantillon. La sélectivité de l'histamine contre les composés interférents semble être basée sur des différences dans les taux de réaction avec l'OPA depuis que l'histamine réagit plus rapidement que les autres composés. Les substances interférentes comme l'ascorbate sont entièrement électro-oxydées et les signaux sont supprimés en amont du détecteur. Ce système est basé sur la méthode AOAC pour la détermination de l'histamine dans les produits de la pêche (AOAC, 2003).

Takagi et Shikata (2004) ont développé une nouvelle méthode FIA, utilisant une électrode à base d'histamine déshydrogénase, qui leur permet de déterminer l'histamine dans les échantillons de poissons. Cette électrode présente une sélectivité élevée à l'histamine et qui n'est pas sensible à d'autres amines primaires, y compris la putrescine, la cadavérine et la tyramine. Non seulement cela permet une analyse plus rapide sans échantillon de nettoyage, mais aussi l'automatisation réduit la dépendance de l'opérateur et les instruments complètent chaque étape de détermination en <1 minute (Takagi et Shikata, 2004). Il s'agit d'une méthode rapide et efficace pour les tests de l'histamine en particulier lors de l'analyse de nombreux échantillons dans les laboratoires de contrôle.

Une méthode enzymatique a également été développée pour la détermination de l'histamine dans le poisson. Celle-ci est basée sur la réaction de diaminoxidase (DAO) avec l'histamine pour produire le peroxyde d'hydrogène qui est couplé avec la peroxydase de raifort et convertit un colorant réduit à sa forme oxydée. Le changement de couleur est utilisé pour

quantifier l'histamine dans l'échantillon (Lerke et al., 1983). Cependant, cette technique présente un inconvénient dans la faible spécificité de l'enzyme, qui peut réagir avec d'autres amines biogènes comme la putrescine et la tyramine, et comme dans le cas de la FIA, une seule amine biogène peut être déterminée en même temps.

Plus récemment, cette réaction enzymatique a été utilisée pour développer un biocapteur à détection ampérométrique pulsée intégrée pour la détermination des amines biogènes dans les échantillons d'anchois salés. La sonde est basée sur une électrode de platine, qui détecte le peroxyde d'hydrogène produit par la réaction catalysée de l'enzyme diamine oxydase (DAO). La DAO est immobilisée sur la surface de l'électrode et les conditions choisies immobilisent l'enzyme sur une membrane de nylon-net en utilisant le tampon phosphate à pH 8.0 et le glutaraldéhyde comme agent de réticulation. Carelli et al. (2007) ont également développé un biocapteur ampérométrique pour la détermination de la teneur en amines biogènes totale en utilisant une diamine oxydase commerciale (à partir de rein de porc) comme bio-composant, piégé par le glutaraldéhyde sur un film bicouche électro-synthétisé. Bien que la DAO commerciale ait présentée une très faible activité, le biocapteur a affiché une sensibilité de réponse élevée dans les expériences de débits, un temps de réponse court, une bonne réponse linéaire et des limites de détection basses. Les caractéristiques d'anti-interférences sont très bonnes et le biocapteur peut être utilisé dans l'analyse de dépistage de produits de la pêche (Carelli et al., 2007).

Une méthode d'électrophorèse capillaire avec détection de conductivité des amines biogènes a été rapportée par Kvasnicka et Voldrich (2006). Une séparation claire des six amines biogènes (cadavérine, putrescine, agmatine, histamine, tryptamine et tyramine) et des autres composants de l'extrait acide de l'échantillon a été réalisée en 10 min. Cette méthode présente des avantages, une faible pénibilité (pas de dérivation, mais seulement une filtration), une sensibilité suffisante, un faible coût d'exploitation (pas de colonne de séparation, mais seulement un capillaire vide), une vitesse d'analyse et un respect de l'environnement (de petites quantités d'électrolytes dilués à base d'eau pour l'analyse). Cette méthode présente également des inconvénients dans la détection non sélective de la conductivité et les limites de détection plus élevées dans les cas des échantillons salés (Kvasnicka et Voldrich, 2006).

L'intérêt des procédures "portables" pour l'analyse des amines biogènes qui seraient capables de filtrer rapidement les produits de la pêche a conduit à l'élaboration des trousseaux commerciales, qui ont été proposées pour la détermination de l'histamine et les applications de l'HACCP (analyse des dangers et maîtrise des points critiques). Un certain nombre de ces trousseaux commerciaux ont été comparés avec la méthode AOAC en analysant des échantillons de thon et de mahi-mahi. Ces kits sont basés sur un test immuno-enzymatique (Staruszkiewicz et Rogers, 2001). Par exemple le kit ALERT[®] et le kit d'histamine Veratox qui sont destinés pour le dosage immuno-enzymatique compétitif directe (ELISA) de l'histamine. Ils sont utilisés pour l'analyse quantitative de l'histamine dans les espèces de scombridés (le thon, le maquereau et le mahi-mahi) par la mesure de la concurrence directe entre l'histamine à doser et le conjugué d'histamine marquée par une enzyme. Le substrat réagit avec la liaison d'enzyme conjuguée pour produire une couleur bleue. Les résultats sont lus à l'aide d'un lecteur microplaque à 450-650 nm. Cette méthode, sans aucune dérivation préalable, offre la simplicité, la rapidité et un coût relativement faible en comparaison avec d'autres méthodes telles que l'HPLC (Staruszkiewicz et Rogers, 2001).

3. Conservateurs naturels d'origine végétale

De nombreuses stratégies de conservation des aliments telles que la réfrigération, la congélation, la réduction de l'activité de l'eau, la restriction des nutriments, l'acidification, la fermentation, la pasteurisation et les additifs synthétiques ont été utilisées traditionnellement pour le contrôle de la contamination microbienne, le rancissement et la détérioration des propriétés sensorielles des produits alimentaires (Davidson, 2001 ; Pokorný, 1991). La sécurité et la durée de conservation des aliments peuvent également être améliorées par l'application de nouvelles technologies comme l'emballage sous atmosphère contrôlée, les films actifs antimicrobiens, les traitements non thermiques, l'irradiation, le conditionnement sous atmosphère modifiée et ainsi de suite (Negi, 2012). Cependant, la plupart de ces procédures peuvent entraîner la perte des propriétés organoleptiques des aliments et réduire l'acceptabilité des consommateurs. Les exigences des consommateurs sont de plus en plus orientées vers les produits alimentaires peu transformés, avec une moindre utilisation des additifs synthétiques et en même temps sans compromettre la sécurité alimentaire. Les additifs synthétiques sont approuvés dans de nombreux pays, la tendance récente est pour l'utilisation de conservateurs naturels qui ne présentent pas d'effets néfastes sur la santé humaine ((Negi, 2012). Les produits naturels, tels que les extraits de plantes, sous forme de composés purs ou sous forme d'extraits standardisés, offrent des possibilités illimitées pour le contrôle de la croissance microbienne et l'oxydation des lipides en raison de leur diversité chimique. L'utilisation d'extraits de plantes avec des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes connues peut prendre une grande importance dans la conservation des aliments. La valeur des plantes se trouve dans certaines substances chimiques qui produisent des actions précises sur la qualité microbiologique, chimique et sensorielle des aliments. Ces composés phytochimiques sont regroupés en plusieurs catégories, dont les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les alcaloïdes, les terpènes, les isothiocyanates, les lectines, les polypeptides ou leurs dérivés oxygénés substitués (Cowan, 1999; Geissman, 1963).

3.1. Antioxydants naturels pour des utilisations alimentaires

Les antioxydants sont des composés ou des systèmes qui retardent l'auto-oxydation en inhibant la formation de radicaux libres ou en interrompant la propagation du radical libre par un ou plusieurs mécanismes (Nawar, 1996). Pour limiter l'oxydation, l'industrie agroalimentaire peut baisser le taux d'oxygène (immersion, vide, atmosphère sous azote),

ralentir les réactions d'auto-oxydation par la réfrigération ou la congélation, détruire les enzymes d'oxydation (polyphénols oxydases) par blanchiment et inhiber l'oxydation induite par l'oxygène moléculaire par l'addition des antioxydants (Marc et al., 2004).

L'antioxydant alimentaire idéal, facilement incorporable et efficace à faible dose, est non toxique, n'entraîne ni coloration, ni odeur, ni saveur indésirable. Il est résistant aux processus technologiques et stable dans le produit fini (Marc et al., 2004). Malgré la puissance de leur activité antioxydante, l'excès de ces antioxydants synthétiques peut être toxique, responsable des mutagenicités et peut même présenter un danger sur la santé humaine (Williams, 1993, 1994).

Récemment, la recherche d'antioxydants naturels pour des utilisations alimentaires ou médicales a attiré beaucoup d'intérêt afin de trouver une solution alternative aux antioxydants synthétiques. Les sources potentielles de composés antioxydants ont été recherchées dans plusieurs types de matières végétales comme les légumes, les fruits, les feuilles, les oléagineux, les cultures de céréales, les écorces et les racines, les herbes et les épices (Ramarathnam et al., 1995). En outre, ces matières végétales contiennent de nombreuses substances phytochimiques tels que les phénols, les composés azotés, les caroténoïdes, et l'acide ascorbique (Velioglu et al., 1998). Mais, les phénols végétaux n'ont pas été complètement étudiés en raison de la complexité de leur nature chimique et leur énorme abondance dans plusieurs matières végétales.

3.1.1. Huiles végétales

Certaines huiles végétales pressées à froid sont de bonnes sources de tocophérols et de caroténoïdes. Les tocopherols se produisent en tant que constituants mineurs dans toutes les huiles végétales et sont parmi les antioxydants les plus utilisés. Leurs activités antioxydantes dépendent beaucoup de la nourriture à laquelle ils sont ajoutés, la concentration utilisée, la disponibilité de l'oxygène et la présence de métaux lourds ainsi que les divers synergistes (Chan, 1987). À des concentrations élevées et en présence des traces de sels de fer et de cuivre, les tocophérols peuvent agir comme pro-oxydants. Une activité antioxydante satisfaisante est habituellement obtenue seulement quand ils sont utilisés en combinaison avec des agents synergiques tels que l'acide ascorbique, l'acide citrique et de certains acides aminés ou avec divers agents chélatants (Pokorný, 1991).

L'huile de sésame est assez stable à l'oxydation et représente une source connue de plusieurs composés antioxydants actifs. Les substances actives sont produites à partir de lignines dans les semences par l'intermédiaire de divers précurseurs tels que sésamoline, qui est hydrolysée par chauffage pour former le sésamol (Fukuda et al, 1986 ; Fukuda et Namiki, 1988).

L'huile d'olive est très stable, non seulement en raison de sa faible teneur en acides gras polyinsaturés, mais aussi en raison de la présence de divers antioxydants naturels au goût amer, provenant principalement de l'hydroxytyrosol (un dérivé de pyrocatechol), qui est un produit de la dégradation de la tyrosine, mais aussi formé à partir d'autres polyphénols (Vazquez et al., 1974). Les composés phénoliques présents dans l'huile d'olive sont une classe très importante d'antioxydants qui affectent non seulement la stabilité de l'huile, mais aussi ses propriétés biologiques et sa qualité nutritionnelle (Visioli et al., 2004). Parmi ses composés phénoliques, on trouve le 4-acétoxy-éthyl-1, le 2-dihydroxy benzène, le 1-acétoxy-pinorésinol, l'apigénine, l'acide caféique, les acides coumariques, l'acide férulique, l'acide gallique, l'acide homovanillique, l'acide p-hydroxybenzoïque, l'hydroxytyrosol et ses dérivés, la lutéoline, l'oleuropéine, le pinorésinol, l'acide protocatéchique, l'acide sinapique, l'acide syringique, le tyrosol et ses dérivés (Boskou et al., 2005).

De plus, les phospholipides (par exemple la lécithine) sont présents dans les huiles végétales brutes, elles sont prélevées au cours de la phase de dégommage de raffinage. Les phospholipides sont souvent utilisés comme synergiques en combinaison avec des antioxydants phénoliques. L'effet stabilisant de l'addition des préparations de phospholipides est souvent attribuée à la présence de substances mineures actives, tels que les tocophérols, les chélateurs de métaux et les composés qui permettent d'accélérer la décomposition d'hydroperoxydes sans produire les radicaux libres (Pokorný, 1991). Cependant, la fraction soluble dans l'éthanol de préparations de lécithine naturelle est plus efficace de chélater les métaux que la fraction insoluble dans l'éthanol. L'activité antioxydante des phospholipides a été attribuée à leur capacité de décomposer les hydroperoxydes. Elle semble être dépendante de la présence de liaisons de choline ou d'éthanolamine comme constituant des phospholipides (Miyazawa et al., 1984).

3.1.2. Céréales

Les céréales sont parmi les composants alimentaires les plus courants, et peuvent être ajoutées à de nombreux produits alimentaires. La farine et les extraits d'avoine ont été parmi les premiers antioxydants proposés pour la stabilisation des graisses, des huiles et des matières grasses alimentaires (Peters et Musher, 1937). Les esters d'acides caféique et férulique semblent être les antioxydants les plus importants dans l'avoine. Des composés similaires, tels que l'oryzanol (un ester de l'acide férulique et de l'alcool triterpéniques), se trouvent dans les autres produits de céréales. D'autres substances actives identifiées comprennent les glycosides flavonoïdes (à partir de balles de riz) et les esters des acides sinapiques et protocatéchiques (à partir de coques de graines de colza). Tous les antioxydants mentionnés ci-dessus à base de céréales proviennent de lignines, qui sont présents dans de nombreuses plantes. Leurs effets chélateur de métaux contribuent à la stabilisation des produits (Pokorný, 1991).

3.1.3 Extraits de plantes

Divers composés phénoliques, tels que les dérivés hydroxylés des acides cinnamiques et benzoïques, sont des constituants communs de nombreux aliments d'origine végétale et la plupart possèdent une activité antioxydante. Les esters de l'acide caféique sont les antioxydants phénoliques d'origine végétale les plus importants, car ils possèdent des niveaux d'activité antioxydante très élevés. Ils sont présents dans de nombreux légumes et champignons, ainsi que dans les noix et les graines oléagineuses. Les flavones et ces composés sont largement présents dans de nombreux aliments d'origine végétale. Les dihydrochalcones polyhydroxylés sont également des antioxydants efficaces trouvés dans les choux et les autres légumes à feuilles, les poivrons, le soja, les pois, les arachides, les fèves de cacao, le coton, et de nombreuses autres plantes (Pokorný, 1991).

Un certain nombre d'épices et d'herbes (les feuilles de laurier, le romarin, la sauge, la marjolaine, l'origan, la cannelle, le persil, le basilic et la menthe) contiennent des composés qui peuvent être enlevés et ajoutés aux systèmes alimentaires pour éviter l'oxydation (Lee et Shibamoto, 2002; Ahn et al., 2007 ; Rojas et Brewer, 2007). Les composants antioxydants d'herbes et d'épices peuvent être extraits et/ou concentrés sous forme d'huiles essentielles ou de résines. Chen et al. (2007) ont rapporté que l'extrait aqueux de romarin (*Rosemarinus officinalis* L.) contient de fortes concentrations de substances phénoliques et flavonoïdes. Les

composés antioxydants les plus actifs du romarin sont les diterpènes phénoliques (carnosique, carnosol, rosmanol, acide rosmadial, 12 methoxycarnosic, épi-et iso-rosmanol) et les acides phénoliques (caféique et rosmarinique) (Frankel, 1991; Frankel et al., 1996 ; Nakatani, 2003). De plus, les extraits éthanolique de l'origan (*Origanum vulgare* L.) contiennent aussi de fortes concentrations de phénols, d'acide rosmarinique, ainsi que des acides et des glycosides qui sont à la fois des antioxydants et des piègeurs efficaces des radicaux d'anions superoxyde (Kim et Cho, 2001; Nakatani, 2003).

L'huile essentielle de marjolaine (*Origanum majorana* L.) contient également une quantité importante de l'acide rosmarinique et du carnosol. Elle est riche en terpinène-4-ol, le cis-sabinene hydrate, p-cymène et γ -terpinène. Ces composés aromatiques peuvent être séparés de la marjolaine et ajoutés à des aliments sans donner des saveurs indésirables. Plusieurs flavonoïdes ont été déterminés dans les extraits de laurier (*Laurus nobilis* L.) comme les flavonoides O-glycosides ou C-glycoside, la catéchine, et le cinnamtannin (Dall'Acqua et al., 2009). En plus, d'autres composés ont été isolés comme les lactones sesquiterpenoides, les alcaloides isoquinolines et la vitamine E (Wettasinghe et Shahidi, 2000).

Comme les herbes, les épices peuvent avoir des effets antioxydants importants (Suhaj, 2006). Parmi les acides phénoliques majeurs identifiés dans les épices on trouve l'acide caféique, l'acide p-coumarique, l'acide férulique et l'acide néochlorogénique. Les flavonoïdes prédominants étaient la quercétine, la lutéoline, l'apigénine, le kaempférol, et l'isorhamnétine (Brewer, 2011).

De nombreux travaux ont étudié l'effet antioxydant des extraits de plantes sur la qualité et la durée de vie de plusieurs espèces de poissons. Kostaki et al. (2009) ont rapporté que la combinaison de l'huile de thym (0.2% v/w) avec l'emballage MAP améliore la qualité sensorielle de filets de loup de mer et assure une durée de conservation de 17 jours par rapport aux échantillons témoins (6 jours). De plus, une addition de 0.1% d'huile de thym (v/w) inhibe l'oxydation des lipides dans les échantillons d'espadon emballés sous MAP à 4 °C (Kykkidou et al., 2009). Erkan et al. (2010) ont trouvé que l'indice de peroxyde et les valeurs de l'acide thiobarbiturique sont plus faibles dans les échantillons de tassergal (*Pomatomus saltatrix*) traités par les huiles de thym et de laurier (1% v/w). Dans une autre expérience, Özyurt et al. (2011) ont étudié l'effet combiné de la glace avec l'extrait de romarin sur la

qualité de sardine (*Sardinella aurita*). Ils ont constaté que la limite d'acceptabilité sensorielle est de 12 jours pour la sardine conservée dans la glace traditionnelle et de 15 jours pour la sardine conservée dans la glace préparée à partir de solution d'extrait de romarin.

3.1.4. Mécanismes d'action des antioxydants naturels

Les composés antioxydants incluant les flavonoïdes, les acides phénoliques, les caroténoïdes et les tocophérols peuvent inhiber l'oxydation Fe^{3+}/AA -induite, piéger les radicaux libres et agir comme des réducteurs (Khanduja, 2003; Ozsoy et al., 2009). Les herbes et les épices contiennent souvent des concentrations élevées de composés phénoliques qui ont une forte activité H-donatrice (Muchuweti et al., 2007).

Les acides phénoliques agissent généralement comme des antioxydants en piégeant les radicaux libres. Les flavonoïdes peuvent piéger les radicaux libres et possèdent aussi un effet chélateur de métaux. La présence de la structure ortho-3,4-dihydroxy augmente l'activité antioxydante de ces composés (Geldof et Engeseth, 2002). Les flavonoïdes peuvent ralentir la transition des métaux en donnant un H^{\bullet} ce qui les rend moins prooxydantes. En outre, les flavones et les flavanones (naringénine) peuvent se lier préférentiellement aux métaux dans les groupes 5-hydroxy et 4-oxo (Fernandez et al., 2002).

Medina et al. (2007) ont constaté que la capacité des acides hydroxycinnamiques à donner des électrons semble jouer le rôle le plus important dans le retard du rancissement dans une matrice de poisson, tandis que l'effet chélateur de métaux et la répartition entre les phases huileuse et aqueuse ne sont pas corrélés avec les activités inhibitrices. Cette dernière constatation peut s'expliquer par le type de matrice dans lequel l'activité oxydative a été étudiée. L'acide caféique est le plus efficace de ce groupe d'antioxydants, similaire au gallate de propyle. Potapovich et Kostyuk (2003) ont indiqué que les catéchines sont les plus efficaces dans l'inhibition de la peroxydation lipidique des microsomes car ils sont capables d'absorber $\bullet O^{2-}$ et de chélater le Fe^{2+} , Fe^{3+} et Cu^{2+} .

Beaucoup de composés flavonoïdes antioxydants sont naturellement produits dans les pigments. Il semble que les flavonoïdes des chloroplastes jouent un rôle photo-protecteur contre $\bullet O^{2-}$ dans les plantes (Agati et al., 2007). Les proanthocyanidines contiennent également des groupes multi -OH qui peuvent avoir un effet chélateur de métaux, donneur d'hydrogène ainsi qu'absorbeur d' $\bullet O^{2-}$ (Shahidi et Wanasundara, 1992).

L' α -tocophérol (vitamine E) est le composé majeur dans les feuilles de plantes où il se trouve dans les enveloppes des chloroplastes et les membranes des thylakoïdes à proximité de

phospholipides (Onibi et al., 2000). Il désactive la photosynthèse d'espèces réactives de l'oxygène (notamment $\cdot\text{O}^{2-}$) et empêche la propagation de la peroxydation lipidique en piégeant les radicaux peroxydes lipidiques dans les membranes des thylakoïdes (Munné-Bosch, 2005). δ -tocophérol est l'antioxydant le plus efficace dans l'huile de tournesol, et le gallate de propyle est le plus efficace dans les huiles les plus saturées. α -tocophérol peut également inhiber l'oxydation des protéines. L'activité antioxydante de δ -tocophérol est d'environ deux fois celle de α -tocophérol à 80 °C, mais elle diminue au fur et à mesure que la température augmente. L'activité antioxydante des α -tocophérol diminue au-dessus de 110 °C, et les deux perdent leur activité au-dessus de 150 °C (Brewer, 2011).

L'acide ascorbique a 4 groupes -OH qui peuvent donner de l'hydrogène à un système oxydant. Il est capable de chélater les ions métalliques (Fe^{2+}), piéger les radicaux libres, absorber l' $\cdot\text{O}^{2-}$ et agir comme un agent réducteur (Brewer, 2011). Aux niveaux élevés (> 1000 mg / kg), l'acide ascorbique déplace l'équilibre entre le ferreux (Fe^{2+}) et le fer ferrique (Fe^{3+}), agit comme un absorbeur d'oxygène et inhibe l'oxydation. Cependant, à des niveaux faibles (<100 mg / kg), il peut catalyser l'oxydation dans le tissu musculaire (Ahn et al., 2007).

Les extraits de nombreuses espèces de la famille *Lamiaceae* (l'origan, la marjolaine, la sarriette, la sauge, le romarin, le thym et le basilic) sont des antioxydants qui ont une forte teneur en phénols totaux (Chen et al., 2007). Ils n'ont pas nécessairement une grande capacité à piéger les radicaux libres, mais semblent contenir des composants qui fonctionnent par au moins 2 différents mécanismes antioxydants (Madsen et al., 1996). Dorman et al. (2003a) ont observé que ses caractéristiques antioxydantes ne sont pas entièrement liées au contenu en phénols totaux, mais elles semblent être fortement dépendantes de l'acide rosmarinique, le principal composant phénolique présent dans ces extraits. L'acide rosmarinique a des groupes-OH vicinaux sur chacun des deux cycles aromatiques, tandis que l'acide carnosique, le carnosol et le rosmanol ont chacun des groupes-OH vicinaux sur un seul cycle aromatique. Un certain nombre de plantes (camomille, églantier, aubépine, et verveine) peut améliorer l'activité des enzymes antioxydantes comme la superoxyde dismutase et la catalase (dépendante de la dose) et fournir des effets protecteurs contre le stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène (Yoo et al., 2008).

3.2. Antimicrobiens naturels pour des utilisations alimentaires

Les antimicrobiens alimentaires sont des composés ou des substances chimiques qui peuvent retarder la croissance microbienne ou causer la mort des micro-organismes dans une matrice alimentaire. Les principales cibles de ces antimicrobiens sont les micro-organismes responsables d'intoxication alimentaire (les agents infectieux et les producteurs de toxines) et les micro-organismes d'altération qui provoquent des modifications d'odeurs, de saveurs et de coloration ainsi que des changements de texture (Davidson, 2001). Les antimicrobiens alimentaires sont généralement classés en substances traditionnelles, synthétiques et naturelles en fonction de leur origine. Bien que, de nombreux agents antimicrobiens synthétiques sont présents naturellement (acide benzoïque dans les canneberges, l'acide sorbique dans les baies de sorbier, l'acide citrique dans les citrons, l'acide malique dans les pommes, l'acide tartrique dans le raisin, etc), la perception des ressources naturelles est devenue importante pour de nombreux consommateurs.

Les variations qualitatives et quantitatives dans la teneur de composés phytochimiques bioactifs dans les extraits de plantes conduisent à leur efficacité variable. En outre, l'extrapolation des résultats obtenus à partir des expériences *in vitro* avec des milieux de laboratoire pour des produits alimentaires n'est pas simple parce que les aliments en réalité sont des matrices complexes qui forment différents micro-environnements en interaction. Bien qu'il existe un potentiel énorme pour les agents antimicrobiens naturels dans la conservation des aliments, la plupart de la littérature présente des données inactives sur des modèles alimentaires ou des milieux de laboratoire. Les concentrations de conservateurs naturels nécessaires pour une efficacité suffisante peuvent être considérablement plus élevées dans les produits alimentaires par rapport aux milieux de laboratoire, or ces concentrations peuvent avoir un impact négatif sur les propriétés organoleptiques des aliments (Negi, 2012).

3.2.1. Huiles essentielles

Les huiles essentielles (HEs) ou les huiles volatiles sont des liquides huileux aromatiques obtenus à partir de matières végétales (fleurs, bourgeons, graines, feuilles, écorce des rameaux, herbes, bois, fruits et racines) par distillation. Les composants individuels des huiles essentielles utilisés dans les aliments sont des extraits de matières végétales ou des produits synthétiques. Les HEs contiennent un mélange de composés, qui comprend des terpènes, des alcools, des acétone, des phénols, des acides, des aldéhydes et des esters qui

sont utilisés principalement comme des arômes alimentaires ou des composants fonctionnels dans des produits pharmaceutiques (Nychas et al., 2003). Bien que la majorité des HEs sont classées comme des substances GRAS (generally recognized as safe), leur utilisation dans les aliments comme conservateurs est souvent limitée en raison de considérations de goût (Lambert et al., 2001).

Les propriétés antimicrobiennes des HEs ne sont pas dues à un mécanisme spécifique, mais plusieurs cibles dans la cellule peuvent contribuer à leur efficacité (Burt, 2004). Différentes études ont montré l'efficacité des HEs et leurs composés actifs dans le contrôle ou l'inhibition de la croissance de micro-organismes pathogènes ou d'altération. Elles ont rapporté sa dépendance à l'égard du pH, de la structure chimique et de la concentration d'HE ou de composé actif ainsi que du nombre et du type de micro-organismes. La sensibilité des bactéries aux HEs augmente avec la diminution du pH de l'aliment, car à un pH faible, le caractère hydrophobe de l'huile augmente, ce qui lui permet de se dissoudre facilement dans les lipides de la membrane cellulaire des bactéries cibles (Burt, 2004). Les coefficients de partage des HEs pourraient également avoir un effet sur l'activité antimicrobienne en influant sur le taux de diffusion à travers la membrane cellulaire, par exemple le coefficient de partage du citral est plus élevé par rapport aux cinnamaldehyde et eugénol ce qui a montré une réduction plus rapide de la bactérie *E. coli* O157: H7 (Raybaudi-Massilia et al., 2009). En outre, les HEs ont montré une efficacité antimicrobienne contre les micro-organismes dépendante de la concentration (Ultee et al., 2000). La température de conservation influe également sur l'efficacité des HEs, comme l'activité bactéricide des différents HEs ou leurs composants actifs contre *E. coli* O157: H7 et *Salmonella Hadar* dans le jus de pomme qui était supérieur à 37 °C qu'à 4 et 21 °C (Friedman et al., 2004).

Plusieurs études ont rapporté l'efficacité de divers extraits de plantes sur la croissance des bactéries d'altération de poissons. L'emballage sous atmosphère modifiée (MAP) combiné avec l'huile de thym 0.1 % (v/w) sont les plus efficaces pour inhiber la croissance des *Pseudomonas* et des bactéries productrices d'H₂S dans les filets de l'espadon (Kykkidou et al., 2009). Attouchi et Sadok (2011) ont rapporté que le traitement des filets de la Dorade royale sauvage et d'élevage avec l'huile essentielle de laurier ou de cumin induit à une diminution de la croissance bactérienne de 0.5 à 1 log UFC/g en prolongeant la durée de vie de filets de poisson d'environ 5 jours dans le stockage sous glace. L'effet des agents antimicrobiens sur la formation de l'histamine a été étudié dans une certaine mesure.

Mejlholm et Dalgaard (2002) ont examiné l'effet antimicrobien de neuf huiles essentielles (le basilic, la cannelle, le clou de girofle, la citronnelle, la marjolaine, l'origan, la sauge, le thym) sur la croissance de *Photobacterium phosphoreum*. Ces huiles essentielles inhibent la croissance de *P. phosphoreum* dans les deux milieux (le milieu liquide et les filets de morue naturellement contaminés). Les huiles d'origan et de cannelle ont la plus forte activité antimicrobienne, suivie par les huiles de citronnelle, de thym, de clous de girofle, de laurier, de marjolaine, de sauge et de basilic. De plus, l'huile d'origan (0.05%, v/w) prolonge la durée de vie de filets de morue naturellement contaminés et emballés sous MAP de 11-12 jours à 21-26 jours à 2 °C. Cependant, ces huiles ne montrent aucun effet sur la croissance de *P. phosphoreum* dans les filets de saumon emballés sous MAP, qui est un poisson gras. Très probablement, les composants actifs de l'huile d'origan, principalement le thymol et le carvacrol, ont été dissous dans la phase lipidique des filets de saumon, et donc sans effet sur la croissance de *P. phosphoreum* dans la phase aqueuse.

3.2.2. Extraits de plantes

Les herbes et les épices alimentaires sont utilisées traditionnellement dans le monde entier comme des additifs alimentaires non seulement pour améliorer les caractéristiques sensorielles des aliments, mais aussi pour prolonger leur durée de vie en réduisant ou en éliminant la survie des bactéries pathogènes. Beaucoup d'extraits d'herbes et d'épices possèdent une activité antimicrobienne contre une variété de bactéries, de levures et de moisissures (Beuchat, 2001; Friedman et al., 2004 ; Raybaudi-Massilia et al., 2009). Ils sont riches en composés phénoliques et exercent un effet antimicrobien. Ils peuvent également conserver les aliments en réduisant l'oxydation des lipides car ils possèdent une activité antioxydante significative (Swarz et al., 2001 ; Shahidi et al., 1997 ; Shan et al., 2009).

Une grande variété de substances phénoliques dérivées de plantes et d'épices possède des activités biologiques puissantes, qui contribuent à leur potentiel de conservation (Surh, 1999). Les espèces du genre *Mentha* (famille de *Lamiaceae*) sont une source riche de composés polyphénoliques, de flavonoïdes, de terpénoïdes, et d'autres composés volatils, ce qui lui confère une forte propriété antimicrobienne (Gulluce et al., 2007). Nguyen et Mittal (2007) ont rapporté des réductions plus de 8 log dans le jus de tomate pasteurisé et inoculé artificiellement de la menthe (utilisée comme conservateur). L'application de l'extrait éthanolique de cumin noir dans la marinade de truite a réduit le nombre de germes aérobies

totaux, de levure et de coliformes (Elgayyar et Draughton, 1999). L'extrait de curcuma (1.5% v/v) seul ou en combinaison avec l'extrait de l'échalote (1.5% chacun, v/v) ont conservé les caractéristiques qualitatives de la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) emballée sous vide pendant un stockage réfrigéré de 20 jours (Pezeshk et al., 2011). Les extraits de l'écorce de grenade (*Punica granatum*) ont également été utilisés pour améliorer la durée de vie des produits à base de viande de poulet en contrôlant le rancissement oxydatif et la croissance bactérienne (Kanatt et al., 2010). L'effet d'un mélange d'origan et de canneberge (0.1 mg de phénol/ml) sur des tranches de bœuf et des filets de morue a été étudié par Lin et al. (2004). Ils ont observé qu'à pH 7, les composés phytochimiques n'ont pas d'effet significatif sur le nombre de germes après 18 h d'incubation, mais à pH 6.0, des différences significatives dans le nombre de germes aérobies totaux sont observées dans la viande et le poisson en tranches. Le mélange d'extraits d'origan-canneberge montre également une réduction log supérieure des germes totaux que les tranches traitées par l'extrait de l'origan ou de canneberge seul (Lin et al., 2004). Bensid et al. (2014) ont rapporté que l'emploi de la glace contenant des extraits de thym (0.04% w/v), de l'origan (0.03% w/v) et de clou de girofle (0.02% w/v) réduit significativement les charges des bactéries aérobies mésophiles et psychrotrophes dans l'anchois, en comparaison avec le lot conservé sous glace traditionnelle. En outre, la glace contenant de l'extrait de romarin a réduit significativement les teneurs en amines biogènes dans la sardine, en particulier l'histamine et putrescine (Özyurt et al., 2011). Les résultats bactériologiques de Kenar et al. (2010) ont montré que la combinaison de l'emballage sous vide avec les extraits naturels de romarin et de sauge entraîne une réduction de la croissance des germes aérobies totaux et des coliformes totaux dans les filets de sardine au cours du stockage réfrigéré. Ces deux extraits ont réduit significativement l'accumulation de l'histamine, la putrescine, la cadaverine et la triméthylamine dans le muscle de poisson (Özogul et al., 2011).

3.2.3. Mécanismes d'action des antimicrobiens naturels

Le mécanisme d'action des antimicrobiens naturels n'est pas entièrement compris, cependant, l'effet perturbateur de la membrane cellulaire par les terpènes et les composés phénoliques, l'effet chélateur de métaux par les phénols et les flavonoïdes, et l'effet sur le matériel génétique par la coumarine et les alcaloïdes sont supposés d'inhiber la croissance des micro-organismes (Cowan, 1999). La cible exacte (s) des antimicrobiens naturels est souvent mal connue, car il est difficile d'identifier un site d'action spécifique où de nombreuses

réactions d'interaction ont lieu simultanément. Il a été observé que les composés de la membrane altérée peuvent également provoquer une fuite de contenu cellulaire, une interférence avec le transport actif ou les enzymes métaboliques, ou une dissipation de l'énergie cellulaire sous forme d'ATP (Davidson, 2001).

Différentes études ont démontré l'efficacité des antimicrobiens et leurs composés actifs dans le contrôle ou l'inhibition de la croissance des micro-organismes pathogènes ou d'altération. La dégradation de la paroi cellulaire, les dommages des protéines membranaires, la fuite du contenu intracellulaire, la coagulation du cytoplasme et l'épuisement de la force motrice des protons peuvent provoquer la mort cellulaire (Burt, 2004 ; Nychas et al., 2003). L'efficacité d'un composé antimicrobien dépend du type, du genre, de l'espèce et de la souche microbienne cible, en plus des facteurs environnementaux tels que le pH, l'activité de l'eau, la température, la composition de l'atmosphère et la charge microbienne initiale du substrat alimentaire (Gould, 1989). La nature de la substance phytochimique antimicrobienne est déterminée par ses propriétés chimiques, telles que la valeur pKa, les ratios hydrophobie/lipophilie, la solubilité et la volatilité (Stratford et Eklund, 2003). Le pH et la polarité sont les facteurs les plus importants qui influent sur l'efficacité d'un agent antimicrobien alimentaire. La polarité est liée à la fois à l'ionisation de la molécule et la contribution de tous les groupes secondaires d'alkyle ou des molécules mères hydrophobes (Davidson, 2001).

Il a été démontré que les composés antibactériens tels que le thymol, l'eugénol, le carvacrol causent une perturbation de la membrane cellulaire, une inhibition de l'activité de l'ATPase, et une libération de l'ATP intracellulaire et des autres constituants de micro-organismes (Burt, 2004 ; Gill et Holley, 2006 ; Lambert et al., 2001 ; Oussalah et al., 2006 ; Raybaudi-Massilia et al., 2009). Oussalah et al. (2006) et Gill et Holley (2006) ont indiqué que l'aldéhyde cinnamique entraîne une diminution de l'ATP intracellulaire par l'activité de l'ATPase sans changements apparents sur la membrane cellulaire des bactéries *E. coli*, *E. coli* O157: H7 et *L. monocytogenes*. Cependant, Kim et al. (1995) ont rapporté une augmentation de la perméabilité membranaire et une fuite du cytoplasme par l'aldéhyde cinnamique. Il interagit également avec des enzymes qui se trouvent sur la paroi de la cellule (Farag et al., 1989). L'interaction de l'aldéhyde cinnamique avec la membrane de la cellule peut provoquer sa perturbation en dispersant la force motrice des protons par une fuite de petits ions ou en

inhibant les enzymes nécessaires à la biosynthèse des acides aminés (Wendakoon et Sakaguchi, 1995).

En outre, les composés phénoliques exercent probablement leurs effets toxiques au niveau de la membrane cellulaire, puisqu'une forte corrélation entre la toxicité et l'hydrophobie de différents composés phénoliques a été observée (Beltrame et al., 1988 ; Sierra-Alvarez et Lettinga, 1991). Les phénols modifient le fonctionnement de la membrane en influençant les ratios protéine-lipide dans la membrane (Keweloh et al., 1990) et induisant l'efflux des ions de potassium (Heipieper et al., 1991). Les catéchines et le gallate d'épigallocatechine interagissent dans la zone polaire lipidique extérieure dans des liposomes et provoquent des perturbations de la membrane cellulaire (Hashimoto et al., 1999 ; Terao et al., 1994). La vanilline a montré un effet antimicrobien en affectant les fonctions membranaires et inhibant la respiration dans plusieurs bactéries (Fitzgerald et al., 2004). Les terpènes s'accumulent dans la membrane cellulaire et provoquent une perte de leur l'intégrité ainsi qu'une dissipation de la force motrice des protons (Sikkema et al., 1995) et une perturbation des structures lipidiques (Keweloh et al., 1990). La lyse de la paroi cellulaire a également été rapportée dans des bactéries après le traitement par des composés phénoliques (Borneman et al., 1986).

3.3. Stabilité des composés phytochimiques pendant la transformation alimentaire

Les composés phytochimiques présents dans de nombreux aliments sont perdus par le traitement thermique tel que la stérilisation, la pasteurisation et la déshydratation. Le traitement thermique a causé des pertes marquées en anthocyanes totales dans les framboises noires (Hager et al., 2008) et les bleuets (Brownmiller et al., 2008). Ce traitement entraîne une diminution significative de l'activité biologique de l'extrait de congé de pilon (Saeedeh Arabshahi et al., 2007), mais aucune différence dans l'activité de l'extrait de tubercules de carottes n'a été observée avant et après le traitement thermique. Dans certains cas, le traitement induit à la formation de nouveaux composés, qui maintiennent ou même accroissent le potentiel de divers extraits (Manzocco et al., 1998 ; Nicoli et al., 1999).

La stabilité thermique des composés phytochimiques additionnés aux aliments dépend de la matrice dans laquelle ils se trouvent. La présence des autres polyphénols et des antioxydants dans la matrice peut aider à stabiliser les composés polyphénoliques. Talcott et

al. (2003) ont démontré que la fortification avec la vitamine C conserve plus de composés phytochimiques pendant le traitement des fruits de la passion jaunes par rapport au témoin non fortifié. Des changements importants dans les niveaux d'isoflavones individuelles sont observés dans les boissons UHT au chocolat aromatisé contenant des protéines de soja en fonction de la température de stockage (4, 23 et 38 °C), tandis que les isoflavones totales sont restées les mêmes, indépendamment de la température ou de la durée de stockage (Hayes et al., 2004). Les extraits de fleurs de marjolaine, de menthe verte, de menthe poivrée et de poudre de basilic ou de leurs extraits purifiés conservent leur activité antioxydante pendant la cuisson. La marinade et la cuisson de poulets réduisent de manière significative les activités antioxydantes des sauces marinades et par conséquent réduit les quantités d'antioxydants disponibles (Thomas et al., 2010). Les composants antioxydants de romarin, de sauge, de basilic, de poivre noir, d'ail et d'oignon semblent être relativement stables. Le traitement par micro-ondes de ces herbes n'a pas d'effet sur la réduction de leur puissance ou de leur effet chélateur de métaux (Bertelli et al., 2004). Cependant, les effets sur d'autres composants tels que les pigments et les composants de saveur sont inconnus.

Il existe plusieurs types de matrices alimentaires auxquelles ces composés antioxydants et antimicrobiens peuvent être ajoutés et de nombreux types de traitement que le produit pourrait alors subir. Il n'y a pas de lignes directrices générales relatives à l'utilisation des extraits de plantes dans les matrices alimentaires (Negi, 2012). D'autres études sont nécessaires pour élucider les conditions d'efficacité de ces substances dans les aliments.

3.4. Évaluation de la toxicité d'extraits de plantes

La plupart des extraits de plantes, qui pourraient trouver une application dans les aliments, ont été consommés par les humains depuis des milliers d'années. Toutefois, des données toxicologiques typiques telles que la dose journalière acceptable (DJA) ou la dose sans effet nocif observé (DSENO) ne sont pas disponibles pour ces extraits. Bien que des directives internationales existent pour l'évaluation de la sécurité des additifs alimentaires, il devient difficile d'attribuer la DJA ou la DSENO pour les extraits de plantes en raison de problèmes de normalisation et de composition variable de ces extraits. Les composés actifs dans les extraits sont affectés par la variété des plantes, l'origine géographique, la partie de la plante utilisée, l'âge et l'état de croissance des plantes, la méthode de séchage ou d'extraction, la préparation, l'emballage et le stockage (Negi, 2012). Les plantes peuvent provenir de

sources conventionnelles alimentaires primaires (extraits de soja, extraits de tomate) ou de sources secondaires telles que les herbes et les épices (huile d'ail, extraits de romarin, extraits de thé vert). Certaines plantes ne peuvent avoir aucun antécédent significatif d'utilisations alimentaires, mais peuvent être tirées de sources qui ont été utilisées dans les médicaments à base de plantes et pris en compte pour des utilisations alimentaires dans diverses régions du monde (Negi, 2012).

Par conséquent, l'Institut International des Sciences de la Vie-Europe (ILSI) a mis au point un document détaillé sur l'utilisation de matières végétales dans les produits alimentaires (Schilter et al., 2003). Ce document souligne que l'ingrédient destiné à l'utilisation dans les produits alimentaires doit être bien identifié et caractérisé. La matière première doit être identifiée avec précision afin de s'assurer que les matières végétales à usage alimentaire sont conformes avec le respect de la qualité et de la quantité de principe actif ainsi que la méthode de préparation doit satisfaire aux bonnes pratiques de fabrication. L'évaluation des risques des produits naturels peut exiger la spécification adéquate de l'identité et de la composition de la plante entière, des extraits ou des composants purifiés, de la variabilité des sources végétales et du procédé utilisé pour obtenir ces constituants. La nature du composé, la connaissance préalable de la consommation humaine, l'exposition probable et l'impact nutritionnel détermineront l'approche des essais toxicologiques. En général, pour les herbes ou les extraits complexes, il n'est pas possible de faire une évaluation des risques sur la base d'un seul composant actif parce que d'autres composants peuvent avoir une importance toxicologique et la matrice alimentaire peut affecter leur biodisponibilité. Un arbre de décision a été suggéré comme une aide dans le processus d'évaluation de la sécurité du matériel végétal à usage alimentaire (cf. Annexe n°1), et un cadre général a été décrit pour l'évaluation de la sécurité des additifs alimentaires d'origine végétale (Schilter et al., 2003).

**PARTIE
EXPERIMENTALE**

1. Objectifs

La sardine (*Sardina pilchardus*) est une espèce de poisson la plus consommée en Algérie. Ce petit pélagique gras est extrêmement périssable et s'altère généralement plus vite que d'autres muscles alimentaires. Elle possède de fortes teneurs en lipides polyinsaturés qui sont très sensibles aux réactions d'oxydation des lipides. Au cours du stockage réfrigéré, un certain nombre de composés chimiques, produits du métabolisme microbien, est associé à une altération de la sardine incluant notamment les amines biogènes dérivées de la décarboxylation bactérienne des acides aminés.

Durant certaines périodes de l'année une part importante de la sardine pêchée est inexploitée en raison de l'insuffisance des moyens de conservation et de transformation. En Algérie, la conservation sous glace est le seul moyen de commercialisation de petits pélagiques. Malheureusement, cette technique n'assure qu'une durée de conservation limitée qui est généralement de 2 ou 3 jours au maximum. Pour une meilleure contribution de l'utilisation de cette espèce, l'emballage sous vide (VP) a été essayé afin d'augmenter la durée de conservation des filets de sardine.

En général, l'emballage sous vide et le stockage à basse température n'affectent pas l'activité enzymatique ou la croissance microbienne et donc n'affectent pas la production des amines biogènes. Par conséquent, il est assez fréquent de combiner ces méthodes avec l'utilisation des additifs alimentaires. Les exigences des consommateurs sont de plus en plus orientées vers les produits alimentaires peu transformés, avec une moindre utilisation des additifs synthétiques en raison de leurs effets néfastes sur la santé humaine. De nombreuses études ont évalué l'activité antioxydante et antimicrobienne de plusieurs extraits de plantes ou d'huiles essentielles sur les poissons. À ce jour et selon nos connaissances, aucune étude portant sur l'application des extraits de *Mentha spicata* et d'*Artemisia campestris* dans les matrices de poisson n'a été publiée. En plus de l'abondance et la disponibilité de ces deux plantes en Algérie, elles possèdent également de fortes teneurs en polyphénols et en flavonoïdes ce qui apportent d'excellentes activités antioxydantes et antimicrobiennes.

Pour répondre à cette problématique, ce travail a pour but d'étudier l'effet combiné de l'emballage sous vide (VP) avec les extraits de *Mentha spicata* et d'*Artemisia campestris* sur la durée d'entreposage et la qualité de filets de sardine (*Sardina pilchardus*) conservés à $3 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 21 jours.

Ainsi, l'étude a été effectuée au sein du laboratoire de technologie de transformation du poisson, Faculté des Pêches, Université de Cukurova – Turquie, durant la période du 15 Décembre 2011 au 15 Mars 2012.

Les objectifs de notre étude sont :

- 1- Apprécier les changements organoleptiques dans les filets de sardine (crue et cuite) après l'addition de 1% d'extrait de plante (utilisé comme additif naturel), afin de déterminer la durée maximale de conservation de la sardine en emballage sous vide.
- 2- Evaluer l'activité antioxydante des additifs naturels sur le développement des réactions d'oxydation des lipides par la détermination de l'indice de peroxyde (PV) et des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (SR-TBA).
- 3- Etudier le pouvoir antimicrobien de ces extraits sur l'évolution des charges bactériennes dans la sardine par l'énumération des germes aérobies totaux, des coliformes totaux, des bactéries lactiques et des bactéries formant histamine.
- 4- Déterminer l'effet de chaque extrait sur la production des amines biogènes dans les filets de sardine, afin d'estimer l'intérêt de ces conservateurs sur la sécurité sanitaire des aliments.

Le logigramme ci –dessous (cf. figure n° 5) résume les étapes du protocole expérimental.

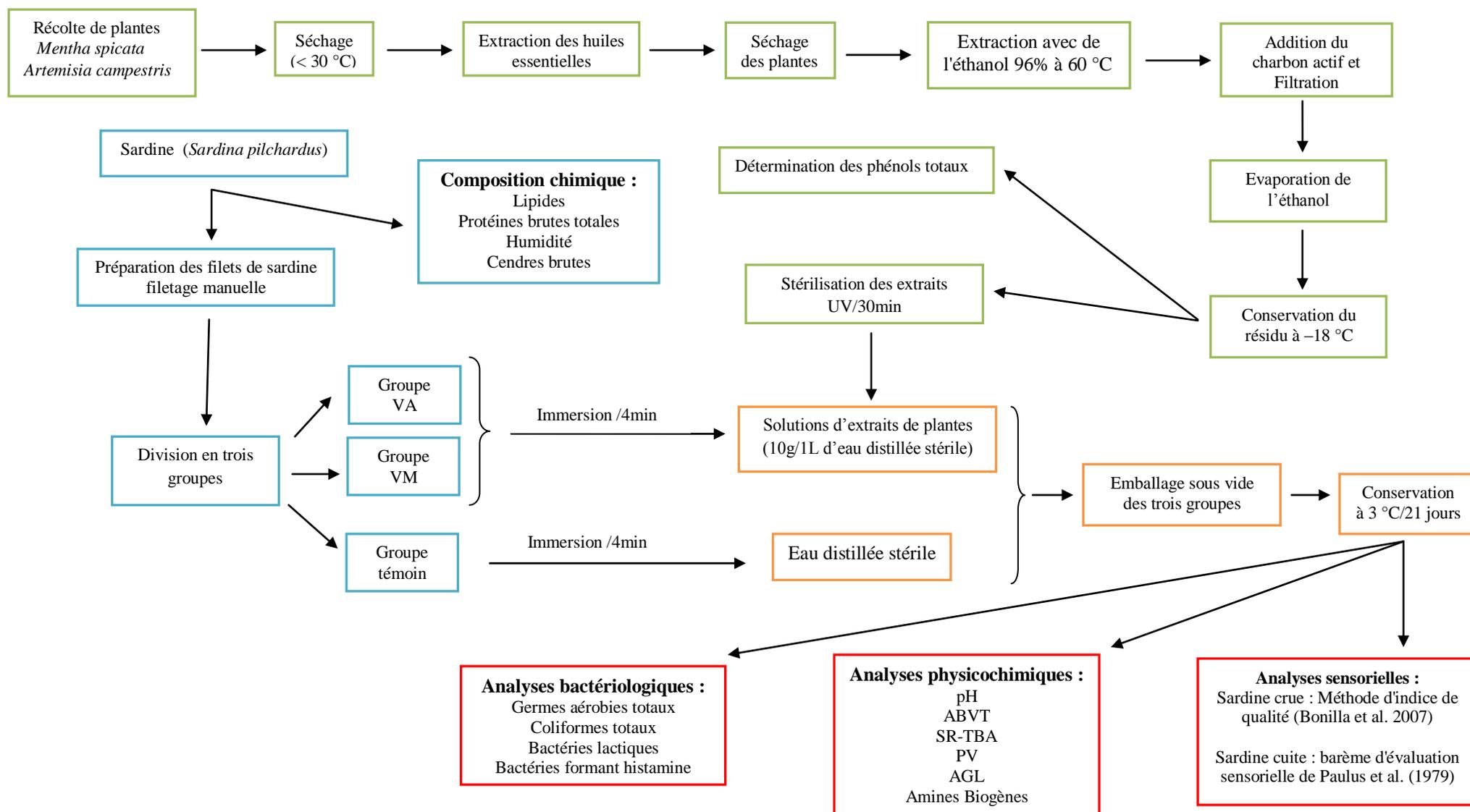


Figure n° 5 : Logigramme des étapes du protocole expérimental

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal

Les parties aériennes (feuilles et tiges) d'artémisia (*Artemisia campestris*) et de menthe (*Mentha spicata* L.) ont été récoltées durant l'été 2011 dans les régions d'oued Moura (Laghouat) et de Brezina (El bayadh), respectivement. L'identification botanique des deux plantes a été réalisée au sein du laboratoire d'écologie végétale, département d'agronomie-Université de Laghouat.

Mentha spicata L. (*M. viridis* L.) est une plante aromatique, communément connue sous le nom de menthe verte ou Nana (نعناع), appartient à la famille des *Lamiaceae* (cf. figure n° 6). Les feuilles de menthe sont glabres d'un vert sombre. Les épis florifères sont plus ou moins disjoints, grêles et allongés (4-8 cm). La menthe verte est très cultivée en Algérie et souvent subspontanée (Quezel et Santa., 1962). Elle est très utilisée dans la préparation du thé ainsi que dans des produits pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires.



Figure n° 6: Menthe verte (*Mentha spicata* L.)

Artemisia campestris est une plante vivace herbacée légèrement aromatique appartenant à la famille des *Asteraceae*, très répandue dans le sud Algérien, communément appelée "dgouft" (cf. figure n° 7). Elle est d'une hauteur de 30-150 cm, à rameaux constituant une panicule plus ou moins ample. Les feuilles d'*Artemisia campestris* sont glabres de couleur verte foncée, les inférieures dipinnatiséquées, les supérieures pinnatiséquées, les basales pétiolées et auriculées, les tiges sont ligneuses à la base striée (Quezel et Santa., 1962). Les

espèces d'*Artemisia* ont plusieurs utilisations médicinales comme des anti-inflammatoires, des anti-tumoraux, des antimicrobiens, des antifongiques et des antioxydants.



Figure n° 7 : *Artemisia campestris* (dougft)

2.1.1. Préparation des extraits de plantes

Le matériel végétal a été séché à l'air et conservé à la température ambiante (< 30 °C) dans l'obscurité jusqu'à son utilisation. Avant l'extraction avec de l'éthanol, les huiles essentielles ont été éliminées à partir du matériel végétal séché par hydrodistillation pendant 4 h, en utilisant un appareil du type Clevenger (cf. figure n° 8).

Après la distillation, les feuilles et les tiges ont été séchées complètement à la température ambiante. Deux cents grammes de matière sèche ont été extraites avec 1,000 ml d'éthanol 96% à 60 °C pendant 2 h. L'extraction a été répétée pour récupérer la majeure partie des composés phénoliques. Après filtration, 40 g de charbon actif ont été ajoutés à l'extrait. Ensuite, le charbon actif a été retiré de l'extrait avec du papier filtre Whatman n°1, puis tout l'éthanol a été évaporé dans un évaporateur rotatif (Heidolph Rotating Evaporator, VV2000, Germany), et le résidu a été stocké à -18 °C dans l'obscurité jusqu'à son utilisation (Chen et al., 1992 ; Kenar et al., 2010). Avant l'analyse des phénols totaux, ces extraits ont été de nouveau dissous dans l'éthanol, puis dilués avec de l'eau ultra-pure jusqu'à 50 ml de volume.



Figure n° 8 : Unité d'hydrodistillation de type Clavenger

2.1.2. Détermination des composés phénoliques totaux

La quantité de composés phénoliques totaux dans les extraits est déterminée selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999) avec des modifications mineures. De chaque solution d'étalonnage, d'échantillons (extraits de menthe et d'artémisia) ou de témoin, 50 μ l sont transférés dans des tubes séparés et mélangés avec 1.85 ml d'eau ultra-pure. Ensuite, 0.20 ml de réactif de Folin-Ciocalteu est ajouté et la solution est gardée à la température ambiante pendant 5 min pour se reposer. Après l'addition de 0.90 ml de solution de carbonate de sodium, le mélange final est parfaitement agité, puis incubé à la température ambiante dans l'obscurité pendant 2 h.

L'absorption est mesurée à 765 nm dans un spectrophotomètre (Lambda 25, Perkin Elmer, Shelton, CT). Les teneurs totales des composés phénoliques sont exprimées en milligrammes d'équivalent d'acide gallique (EAG) par gramme d'échantillon (poids sec) en utilisant la courbe d'étalonnage tracée avec de l'acide gallique ($0 - 500$ mg/litre; $y = 0.0021x + 0.0724$, $R^2 = 0.9996$, où y est la densité optique, x est la concentration de l'acide gallique et R^2 est le coefficient de corrélation) (cf. Annexe n° 2).

Trois mesures sont appliquées pour une meilleure détermination du taux des phénols totaux dans chaque extrait.

2.2. Préparation des échantillons de poisson

La sardine (*Sardina pilchardus*) a été capturée en Février 2012 dans la région nord-est de la mer Méditerranée (Turquie). Elle a été conservée dans la glace pendant 6 h post-capture jusqu'à l'arrivée au laboratoire. La moyenne du poids et de la longueur de sardine était de 26.10 ± 2.54 g et 15.15 ± 0.92 cm, respectivement.

Le poisson a été immédiatement vidé, décapité et fileté, sans enlèvement de la peau. Ensuite, les filets ont été lavés avec de l'eau du robinet, puis ils ont été divisés en trois groupes. Les groupes traités ont été immergés dans 1 litre d'eau distillée stérile contenant 10 g d'extrait d'artémisia (groupe VA) ou de menthe (groupe VM) stérile pendant 4 minutes, tandis que le témoin (groupe VC) a été seulement immergé dans l'eau distillée stérile sans extraits de plantes. Les extraits utilisés dans cette étude ont été stérilisés avec de la lumière UV pendant 30 min.

Tous les groupes (traités et non traités) ont été emballés dans des sachets de film de polyamide (Polinas, Manisa, Turquie) en utilisant une machine d'emballage sous vide (RV50, Reepack, Italie). L'épaisseur du film est de 90 μ m, la perméabilité de l'eau et de l'oxygène sont de $8.5 \text{ g/m}^2 \text{ 24 h}$ et $160 \text{ cm}^3/\text{m}^2 \text{ 24 h}$, respectivement (cf. figure n° 9). Tous les échantillons ont été conservés à 3 ± 1 °C pendant une période de 21 jours. Les analyses sensorielles, chimiques et bactériologiques ont été réalisées en triple aux jours 0, 3, 6, 8, 10, 14, 17, et 21.

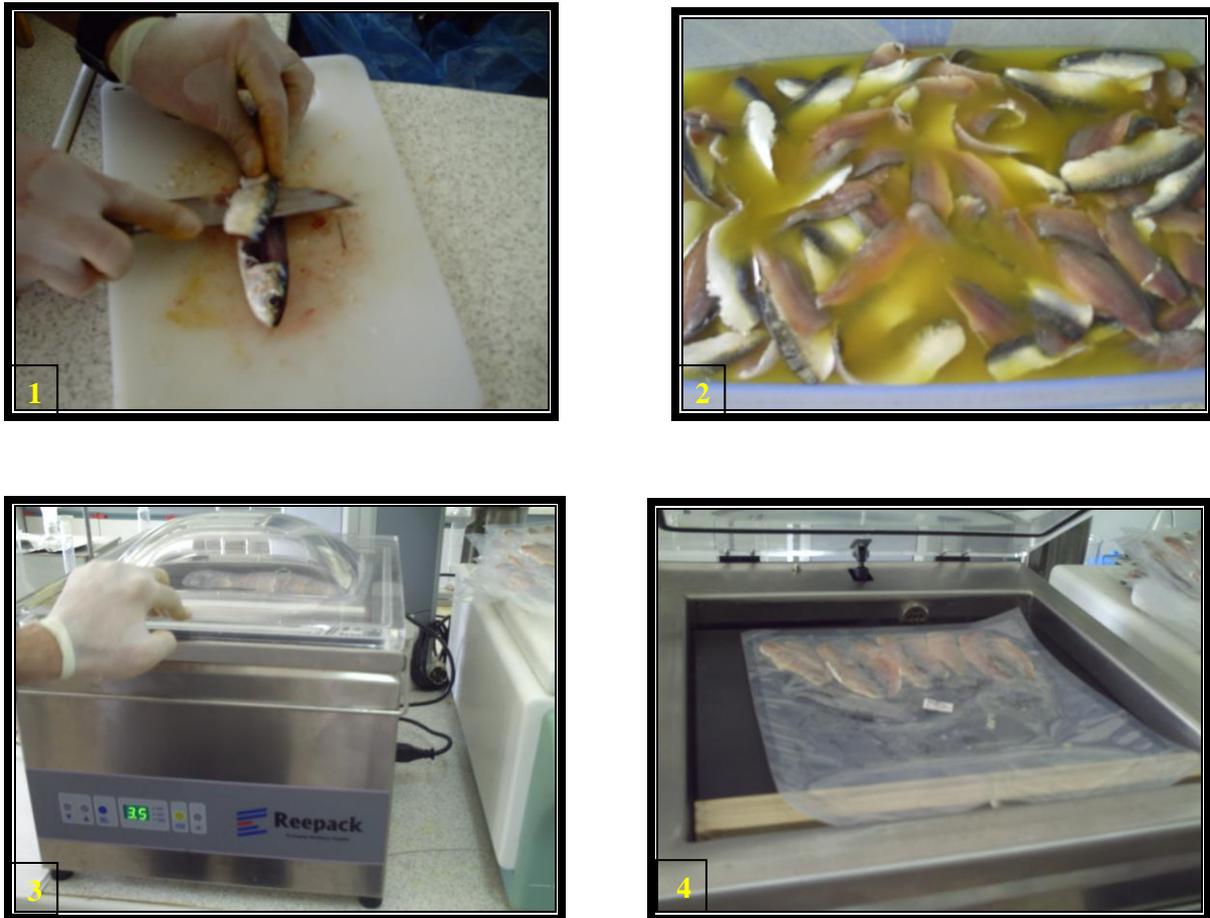


Figure n° 9: Les étapes de préparation des échantillons de sardine

2.3. Composition chimique

2.3.1. Teneur en lipides

L'analyse des lipides est effectuée conformément à la méthode appliquée par Bligh et Dyer (1959). Dix grammes environ d'échantillon sont homogénéisés avec 120 ml de méthanol/chloroforme (1/2 : v/v) à l'aide d'un homogénéisateur du type Ultra-Turax pendant 2 minutes, puis le mélange est filtré avec du papier filtre (Scliecher & Schuell, 5951/2 185 mm) et transféré dans une fiole jaugée tarée. Ensuite, 20 ml de solution à 0.4% de CaCl_2 sont ajoutés aux filtrats, et après avoir laissé reposer ce mélange, les ballons sont gardés hermétiquement fermés dans l'obscurité pendant une nuit. Le lendemain, les couches supérieures composées de méthanol-eau sont prises avec une ampoule à décanter, et la partie

chloroforme-lipidique restante dans les ballons est évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif à 60 °C. Ensuite, les ballons sont gardés au four à 150 °C pendant 1 heure, puis refroidis à la température ambiante dans un dessiccateur puis les ballons sont pesés à l'aide d'une balance analytique (précision 0.1 mg).

La formule suivante est utilisée pour calculer la teneur en lipides.

$$\text{Teneur en lipides (\%)} = \frac{[\text{Poids de ballon (g)} + \text{lipides (g)}] - [\text{Poids de ballon (g)}] \times 100}{\text{Poids de l'échantillon (g)}}$$

2.3.2. Dosage de l'humidité

Le dosage de l'humidité est réalisé sur la base de la méthode de référence AOAC (1990). Tout d'abord, des boîtes de Pétri en verre sont séchées dans une étuve à 105 °C pendant 1 heure, puis refroidies pendant 30 minutes dans un dessiccateur et tarées à l'aide d'une balance analytique (précision 0.1 mg). Ensuite, dans chaque boîte tarée, 4–5g d'échantillon sont pesés et répartis uniformément, puis placé dans les boîtes sans couvercles dans l'étuve préchauffée à 105 °C pendant 8 heures. Après avoir retiré les boîtes de l'étuve (avec couvercles), elles sont refroidies pendant 30 minutes dans un dessiccateur et tarées à l'aide d'une balance analytique (précision 0.1 mg).

La teneur en humidité, exprimée en pourcentage de l'échantillon, est donnée par la formule suivante.

$$\text{Teneur en humidité (\%)} = \frac{(m - m_0) \times 100}{m}$$

où:

m = poids initial, en grammes, de la prise d'essai,

m₀ = poids, en grammes, de la prise d'essai sèche.

2.3.3. Protéines brutes totales

Les protéines brutes totales sont déterminées selon la méthode de Kjeldahl (AOAC, 1984). Dans un matras de Kjeldahl, 1 g d'échantillon est homogénéisé avec 2 comprimés Kjeldahl (Merck, TP826558) et 25 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4), puis chauffé dans une unité de minéralisation pendant 2–3 heures jusqu'à obtention d'une couleur verte. Après avoir laissé la solution refroidi à la température ambiante, 75 ml d'eau sont ajoutés. Ensuite, 25 ml de solution d'acide borique (H_3BO_3) 40% sont introduits dans un flacon collecteur, puis la distillation est procédée avec du NaOH à 40% pendant 6 minutes en plaçant le matras dans le dispositif de distillation du type Kjeldahl.

La solution recueillie dans le flacon collecteur est titrée par une solution d'acide chlorhydrique (HCl) 0.1 M. La quantité d'HCl utilisée est enregistrée et la teneur en protéines est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$N (\%) = \frac{14.01 \times (V_1 - V_0) \times c \times 100}{m \times 10}$$

$$\text{La teneur en protéine (\%)} = \% N \times 6.25$$

où:

V_0 = volume (ml) d'acide chlorhydrique utilisé dans l'essai à blanc,

V_1 = volume (ml) d'acide chlorhydrique utilisé dans la prise d'essai,

c = concentration (mol/l) de la solution étalon volumétrique d'acide chlorhydrique,

m = poids (g) de la prise d'essai,

6.25 = coefficient de conversion.

2.3.4. Cendres brutes

Des creusets en porcelaine sont utilisés pour l'analyse des cendres brutes selon la méthode AOAC (1990). Tout d'abord, les creusets sont séchés au four à 103 °C pendant 2 heures, puis refroidis dans un dessiccateur et tarés à l'aide d'une balance sensible (précision 0.1 mg). Ensuite, 3.3–5 g d'échantillon sont pesés dans chaque creuset taré, puis introduits

dans un four à moufle réglé à 550 °C pendant 4 heures jusqu'à obtention de cendres gris clair. Après refroidissement à la température ambiante dans le dessiccateur, les creusets sont pesés à l'aide d'une balance analytique (précision 0.1 mg).

Le résultat de cendres brutes, exprimé en pourcentage de l'échantillon, est donné par la formule suivante :

$$\text{Cendres brutes (\%)} = \frac{[\text{Tare (g)} + \text{cendres brutes (g)}] - \text{Tare (g)} \times 100}{\text{Poids de l'échantillon (g)}}$$

2.4. Appréciation organoleptique

2.4.1. Appréciation organoleptique des filets de poisson cru

En absence d'un barème ou d'une méthode d'évaluation organoleptique des filets de sardine, le barème de la méthode d'indice de qualité développé par Bonilla et al. (2007) pour les filets de morue fraîche (*Gadus morhua*), avec des modifications mineures, a été utilisé pour l'analyse sensorielle des filets de sardine crue (cf. tableau n° 3).

Le barème se compose de huit paramètres de qualité. Un autre paramètre de qualité (9^{ème} paramètre) a été proposé dans ce barème afin d'apprécier "l'odeur de l'extrait" de plante dans les filets de poisson cru.

Il comporte quatre descripteurs simples et un système de cotation des défauts de 0 à un maximum de 3. La note 0 est attribuée au poisson très frais. Cette note augmente au fur et à mesure que le poisson se décompose, la limite est la note 3. La somme totale des points de défauts est 18.

L'équipe de l'appréciation organoleptique se compose de sept examinateurs réguliers qui ont été formés à l'évaluation de la qualité du poisson avant l'expérience. Trois échantillons pour chaque groupe ont été prélevés à des intervalles réguliers pour l'analyse sensorielle. Les membres du panel d'évaluation sensorielle ont été invités à indiquer si le poisson était acceptable ou non, afin de déterminer la durée de vie de la sardine.

Tableau n° 3 : Barème de la méthode d'indice de qualité pour les filets de morue fraîche (*Gadus morhua*) modifié (Bonilla et al., 2007).

Paramètres de qualité		Descripteurs	Témoin	Artemisia 1%	Mentha 1%		
Peau	Eclat	Pigmentation iridescente	0	0	0		
		Légèrement terne	1	1	1		
Terne		2	2	2			
Mucus		Uniforme, mince, transparent	0	0	0		
		Moins épais, opaque	1	1	1		
		Caillé, épais, jaunâtre	2	2	2		
Chair	Texture	Ferme	0	0	0		
		Légèrement élastique	1	1	1		
		Très élastique	2	2	2		
	Sang		Rouge vif, absent	0	0	0	
			Rouge terne	1	1	1	
			Brun foncé	2	2	2	
	Odeur		Fraîche, neutre	0	0	0	
			D'algues marines	1	1	1	
			Lait caillé	2	2	2	
	Acétique, ammoniacale			3	3	3	
			Couleur	Blanc, gris	0	0	0
				Jaunâtre et brun foncé	1	1	1
	Eclat		Transparent	0	0	0	
			Opaque	1	1	1	
Béance		Aucun béant	0	0	0		
		Légère béante, moins de 25% du filet	1	1	1		
		Légère béante, 25%-75% du filet	2	2	2		
		Béant profond, plus de 75% du filet	3	3	3		
Odeur de l'extrait		Absence	0	0	0		
		Légèrement appréciable	1	1	1		
		Intense	2	2	2		

Indice de qualité (0-18)

*Voulez-vous acheter ce filet de poisson ?

Oui

Non

2.4.2. Appréciation organoleptique des filets de poisson cuit

L'évaluation sensorielle des filets de poisson cuit a été effectuée conformément au barème d'évaluation sensorielle de Paulus et al. (1979). Les filets de sardine ont été cuits au four micro-onde pendant 2 min (300 W), et ensuite servis aux examinateurs pour l'évaluation de la couleur, l'odeur, la saveur, la texture et l'acceptabilité générale, en utilisant une échelle hédonique de neuf points (de 1 = détester extrêmement à 9 = aimer extrêmement).

Le tableau ci-dessous représente l'échelle hédonique utilisée pour l'évaluation sensorielle de la sardine cuite au four.

Tableau n° 4 : Echelle hédonique utilisée pour l'évaluation organoleptique de la sardine cuite au four (Paulus et al., 1979).

Note Paramètre	9	8	7	6	5	4	3	2	1
Couleur									
Odeur									
Saveur									
Texture									
Acceptabilité générale									

9 : Très bonne qualité,

8-7 : Bonne qualité,

6-5 : Acceptable,

4-3 : Mauvaise qualité,

2-1 : Inacceptable.

2.5. Analyses physico-chimiques

2.5.1. pH

La mesure de pH est effectuée sur des filets de sardine homogénéisés avec de l'eau distillée (ratio poids/volume : 1/10) à l'aide d'un pH-mètre (315i, WTW GmbH, Weilheim, Allemagne).

2.5.2. Dosage de l'Azote basique volatil total (ABVT)

Le dosage de l'azote basique volatil total (ABVT) est réalisé selon la méthode d'Antonacopoulos et Vyncke (1989). Dans un matras de Kjeldahl, 10 grammes de filets de sardine sont homogénéisés avec environ 2-3 g de l'oxyde de magnésium (MgO) et 2-3 gouttes de l'émulsion de silicone antimousse. Avant l'analyse de l'échantillon, 10 ml d'acide borique 3% sont ajoutés avec environ 6-8 gouttes de rouge de méthyle dans un erlenmeyer gradué (collecteur) et le mélange est complété avec de l'eau distillée à 100 ml de volume.

Lorsque la distillation est terminée, 200 ml de distillat sont titrés par une solution d'acide chlorhydrique (HCl) 0.1 N (changement de couleur du vert au rouge-violet). La teneur en ABVT, exprimée en milligrammes d'ABVT pour 100 g de chair, est donnée par la formule suivante :

$$\text{ABVT (mg/ 100g)} = \frac{\text{Volume utilisé d'acide 0.1 N (ml)} \times 1.4 \times 100}{\text{Poids de l'échantillon (g)}}$$

2.5.3. Dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (SR-TBA)

La valeur des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (SR-TBA) est déterminée selon la méthode de Tarladgis et al. (1960) pour les filets de sardine. Dans un matras de Kjeldahl, 10 g d'échantillon sont homogénéisés avec 97.5 ml d'eau distillée et 2.5 ml d'une solution HCl 6 N. Ensuite, le mélange est introduit dans l'appareil Kjeldahl et le processus de distillation est poursuivi jusqu'à 200 ml de distillat.

Dans un tube séparé, 5 ml de distillat sont additionnés à 5 ml de réactif TBA contenant 0.02 M de TBA dans l'acide acétique glacial à 90%. Le mélange final est parfaitement agité puis incubé dans l'eau bouillante pendant 35 min. Après refroidissement avec de l'eau du

robinet, l'absorbance de la solution rose est lue à 538 nm dans un spectrophotomètre (Lambda 25, Perkin Elmer, Shelton, CT).

La constante 7.8 est utilisée pour calculer la valeur SR-TBA de distillation et les résultats sont exprimés en milligrammes de malonaldéhyde par kg de chair de poisson.

2.5.4. Indice de peroxyde (PV)

L'indice de peroxyde (PV) est déterminé par le dosage iodométrique des extraits de Bligh et Dyer (1959) après addition de l'acide acétique, selon la méthode de l'AOCS (1994). Pour un échantillon de 1 g de lipides, 20 ml de chloroforme sont ajoutés, suivi de 50 ml de solution d'acide acétique/chloroforme (60:40). Après agitation, 1 ml d'iodure de potassium saturé est additionné, et après avoir laissé reposer le mélange dans l'obscurité pendant 30 min, 100 ml d'eau distillée avec 4-5 gouttes d'amidon 1% sont ajoutés. La solution est titrée avec 0.002 M du thiosulfate de sodium dans un endroit sombre jusqu'à la disparition de la couleur bleue.

L'indice de peroxyde, exprimé en milli-équivalents de peroxyde d'oxygène par kilogramme de matière grasse, est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Indice de peroxide (mEq/kg)} = \frac{2 (V_1 - V_0)}{\text{Poids de l'échantillon (g)}}$$

où:

V_0 = volume (ml) de thiosulfate de sodium 0.002 M utilisé dans l'essai à blanc

V_1 = volume (ml) de thiosulfate de sodium 0.002 M utilisé dans la prise d'essai.

2.5.5. Analyse des acides gras libres (AGL)

L'analyse des acides gras libres (AGL) est effectuée selon la procédure de l'AOCS (1994) par titration acidimétrique des extraits de Bligh et Dyer (1959) après addition de l'éthanol et utilisation de la phénolphthaléine comme indicateur. Pour un échantillon de 0.5 g de lipides, 50 ml d'éther diéthylique/éthanol (25:25) sont ajoutés. Après agitation, 1 ml de l'indicateur phénolphthaléine 1% est additionné. Ensuite, la solution est titrée avec de l'hydroxyde de sodium (NaOH) 0.1 M jusqu'à la persistance d'une couleur rose pendant plus de 15 secondes.

La teneur en acides gras libres (AGL), exprimée en % d'acide oléique, est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Teneur en acides gras libres (\% d'acide oléique)} = \frac{(V_1 - V_0) \times 2.805}{\text{Poids de l'échantillon (g)}}$$

où:

V_0 = volume (ml) d'hydroxyde de sodium (NaOH) 0.1 M utilisé dans l'essai à blanc,

V_1 = volume (ml) d'hydroxyde de sodium (NaOH) 0.1 M utilisé dans la prise d'essai,

2.805 = facteur de conversion.

2.5.6. Analyse des amines biogènes

L'analyse de l'ammoniac et des amines biogènes a été réalisée selon la méthode chromatographique rapide (HPLC) d'Özogul et al. (2002).

2.5.6.1. Préparation des solutions d'amine standard

Tous les étalons d'amines biogènes proviennent de Sigma-Aldrich (Munich, Allemagne). Ces étalons "Chlorhydrate de tryptamine (122,8 mg), dichlorhydrate de putrescine (182,9 mg), 2-chlorhydrate de phényléthylamine (130,1 mg), dichlorhydrate de cadaverine (171,4 mg), trihydrochloride de spermidine (175,3 mg), tétrahydrochlorure de spermine (172,0 mg), dichlorhydrate d'histamine (165,7 mg), chlorhydrate de tyramine (126,7 mg), de la 5-hydroxytryptamine (sérotonine) (133,9 mg), chlorhydrate de 3-hydroxytyramine

(dopamine) (123,8 mg), sulfate d'agmatine (175. 4 mg), chlorhydrate de triméthylamine (161,7 mg) et chlorure d'ammoniac (296,9 mg)" ont été dissous dans 10 ml d'eau qualité HPLC afin d'obtenir une concentration finale de base libre standard de 10 mg/ml pour chaque amine. Une courbe d'étalonnage a été préparée dans la plage de 0–5 mg/ml (0, 0.005, 0.05, 0.5 et 5 mg/ml).

2.5.6.2. Préparation des échantillons pour l'analyse des amines biogènes

Cinq grammes de muscle dorsal de filets de sardine (sans peau) ont été prélevé et transféré dans un tube centrifuge de 50 ml. Ensuite, l'échantillon a été homogénéisé avec 20 ml d'acide trichloroacétique (TCA) 6% pendant 3 min à l'aide d'un homogénéisateur Ultra-Turax, puis centrifugé à 11180×g pendant 10 min à 4 °C dans une centrifugeuse réfrigérée (Hettich 32R, Tuttlingen, Allemagne) et filtré avec du papier filtre Whatman No. 1 (Maidenstone, Royaume-Uni). Le filtrat a été complété avec de l'eau distillée jusqu'à 50 ml de volume et stocké dans un congélateur (–18 °C) jusqu'à la dérivatisation.

2.5.6.3. Procédure de dérivatisation

Une solution a été préparée par la dissolution de chlorure de benzoyle 2% (99%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) dans l'acétonitrile pour améliorer la réaction avec les amines biogènes.

Pour la dérivatisation des solutions d'amine standard, 50 µl ont été prélevés (2 ml pour les échantillons extraits de la sardine) de chaque solution de base libre standard (10 mg/ml). Un millilitre d'hydroxyde de sodium 2 M a été ajouté, suivi par 1 ml de chlorure de benzoyle, et agité dans un Vortex (ZX3, Welp Scientifica, Usmate (Milano), Italie) pendant 1 min. Le mélange réactionnel a été laissé à la température ambiante (24 °C) pendant 20 min. La benzoylation a été arrêtée par l'addition de 2 ml de solution de chlorure de sodium saturée. Ensuite, la solution a été extraite deux fois avec 2 ml d'éther diéthylique et la couche organique supérieure a été transférée dans un tube propre.

Après mélange et évaporation à sec dans un courant d'azote pur (99,9%, Linde Gas, Adana, Turquie), le résidu a été dissous dans 500 µl d'acétonitrile, puis 5 µl de filtrat ont été injectés dans l'HPLC.

2.5.6.4. Conditions chromatographiques

Un chromatographe en phase liquide à haute performance (HPLC) (Shimadzu–Proeminence, Kyoto, Japon), équipé d'un détecteur à barrette diode SPD-M20A, de deux pompes binaires de gradient (Shimadzu LC-10AT), d'un échantillonneur automatique (SIL 20AC), d'un four à colonne (CTO-20AC) et d'un Module de communication bus (CBM-20A) avec une unité vanne FCV-11AL, a été employé pour l'analyse des amines biogènes (cf. figure n° 10). La température du four est réglée à 30 °C. Les données sont traitées à l'aide d'un programme LC–Solution version 1.11 SP1 (Shimadzu, Kyoto, Japon). La colonne utilisée est une phase inverse, Sphérisorb 5 Si C18 pH-St, 250 × colonne 4.6 mm (Phenomenex, Macclesfield, Cheshire, Royaume-Uni).



Figure n° 10: Chromatographe en phase liquide à haute performance (HPLC)
(Shimadzu–Proeminence, Kyoto, Japon)

La phase mobile est composée d'acétonitrile et d'eau qualité HPLC. La séparation chromatographique est réalisée par une élution à gradient continu avec de l'acétonitrile (éluant A) et de l'eau qualité HPLC (éluant B). Le gradient est débuté à 40% d'acétonitrile et ensuite augmenté jusqu'à 70% en 15 min. Pour assurer une séparation complète, le gradient est exécuté pendant 20 minutes.

2.6. Analyses bactériologiques

Trois échantillons ont été prélevés de chaque groupe testé pour le dénombrement des germes aérobies totaux (APC), des bactéries lactiques (LAB), des coliformes totaux (CC) et des bactéries formant histamine (HFB).

Dix grammes (10 g) de muscle dorsal ont été homogénéisés avec 90 ml de solution de Ringer stérile (Merck, 1.15525.0001, Darmstadt, Germany) au 1/4, puis broyés à l'aide d'un Stomacher[®] (IUL, Barcelone, Espagne) pendant 3 min. Le broyat a été alors utilisé pour préparer des dilutions décimales successives à partir desquelles les milieux de cultures seront ensemencés.

2.6.1. Germes aérobies totaux (APC)

Pour le dénombrement des APC, une gélose standard pour dénombrement (PCA) (70152, Aldrich, Steinheim, Suisse) a été coulé en boîtes de Petri. Après refroidissement, 0.1 ml de chaque dilution décimale a été ensemencé en surface, puis les boîtes ont été incubées à 30 °C pendant 2 jours. Toutes les colonies ont été dénombrées dans les boîtes contenant au minimum 30 et au plus 300 colonies (Norme NF-V 08-51, 1999).

2.6.2. Coliformes totaux (CC)

La gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBL) (Oxoid, Ltd, Basingstoke, Royaume-Uni) a été utilisée pour le dénombrement des coliformes totaux. Un millilitre de chaque dilution décimale a été transféré dans des boîtes de Pétri en utilisant la méthode d'ensemencement en profondeur (double couches). Après 24 h d'incubation à 30 °C, les colonies rouges ayant un diamètre d'au moins 0.5 mm ont été dénombrées (Norme NF-V 08-050, 2009).

2.6.3. Bactéries lactiques (LAB)

Pour LAB, 0.1 ml de chaque dilution décimale a été ensemencé à la surface du milieu gélosé Man Rogosa et Sharpe agar (MRS; 69964, Fluka). Ensuite, l'inoculum a été recouvert avec une seconde couche du même milieu (2 à 3 mm). Après solidification, les boîtes ont été

incubées pendant 5 jours à 30 °C. Les colonies de *Lactobacillus* ont été dénombrées dans les boîtes contenant au minimum 30 et au plus 300 colonies (Norme NF-V 04-503, 1988).

2.6.4. Bactéries formant histamine (HFB)

Le milieu histidine décarboxylase de Niven modifié par Smith et al. (1982) a été utilisé pour l'isolement et le dénombrement des HFB (cf. Annexe n° 3). Le milieu a été ajusté à pH 5.25 avant le chauffage, puis stérilisé à 121 °C pendant 7 min pour éviter l'hydrolyse excessive de l'agar.

Un millilitre de chaque dilution décimale a été transféré dans des boîtes de Pétri en utilisant la méthode d'ensemencement en profondeur. Après solidification, les boîtes ont été recouvertes avec une seconde couche du milieu Niven. Les colonies pourpres (entourées d'un halo violet sur fond jaune) ont été comptées après incubation des boîtes à 35 °C pendant 72 h.

2.7. Analyses statistiques

Les moyennes et les écarts type (SD) ont été calculés à partir des données obtenues de trois échantillons pour chaque groupe et pour chaque période de stockage spécifique. Les données ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA) et des tests de comparaisons multiples de Duncan.

L'analyse de corrélation de Pearson a été utilisée pour examiner la relation entre le taux d'histamine et le nombre de bactéries formant histamine enregistré dans les trois groupes testés durant la période de conservation. Toutes les statistiques ont été réalisées avec le logiciel statistique SPSS version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Résultats et discussion

3.1. Composés phénoliques totaux

Selon le tableau n° 5, le rendement de l'extrait brut le plus élevé est celui de *M. spicata* avec 50 mg/g de matière sèche suivi d'*A. campestris* (31.50 mg/g). Les teneurs en phénols totaux des extraits éthanoliques de menthe et d'*Artemisia* sont enregistrées aux valeurs 31.27 ± 3.36 et 57.80 ± 4.62 mg d'EAG/g d'échantillon (poids sec), respectivement. Dorman et al. (2003b) ont rapporté des teneurs en composés phénoliques totaux dans l'intervalle de 128 à 230 mg d'EAG/g d'extrait (poids sec) à partir de différentes espèces de *Mentha*. Cependant, Kanatt et al. (2007) ont enregistré un taux plus faible en phénols totaux dans l'extrait de *M. spicata* avec une valeur de 25.62 ± 3.14 mg en termes d'équivalent catéchine/g de poids humide de l'échantillon. Les extraits aqueux d'*Artemisia campestris* sont formés de 56.67 ± 1.94 mg/g de polyphénols totaux exprimés en EAG (Saoudi et al., 2010). De plus, Djeridane et al. (2010) ont enregistré une teneur en polyphénols de 40.92 mg EAG/g de matière sèche dans l'extrait hydromethanolic d'*Artemisia campestris*. Dans la présente étude, la teneur la plus élevée en composés phénoliques totaux est enregistrée dans l'extrait d'*A. campestris* comparé à l'extrait de *M. spicata* (cf. tableau n° 5). La quantification des composés phénoliques dans l'extrait de plante est influencée par la nature chimique de l'analyte, le procédé d'extraction utilisé, la taille des particules de l'échantillon, le temps et les conditions de stockage, ainsi que par la méthode de dosage, la sélection des normes et la présence de substances interférentes (Naczki et Shahidi, 2006).

Tableau n° 5: Le rendement et la teneur en phénols totaux des extraits éthanoliques d'*Artemisia campestris* et de *Mentha spicata* L.

Plante	<i>Artemisia campestris</i>	<i>Mentha spicata</i> L.
Rendement de l'extrait brut (mg/g de matière sèche)	31.50	50
Teneur en phénols totaux (EAG/g d'échantillon)	57.80 ± 4.62	31.27 ± 3.36

3.2. Composition chimique

Les teneurs en protéines, lipides, humidité et cendres enregistrées dans la sardine fraîche sont de $19.18 \pm 0.01\%$, $9.6 \pm 0.11\%$, $69.59 \pm 0.71\%$ et $1.63 \pm 0.34\%$, respectivement (cf. tableau n° 6). Burt et Hardy (1992) ont constaté que la composition chimique des sardines variait de 57 à 78% d'eau, de 17 à 21% de protéines, et de 1 à 21% de lipides. Dans d'autres études similaires, les protéines et les lipides dans la sardine fraîche variant de 16.2% et de 5.2% à 19.9% et 12.2%, respectivement (Serdaroglu et Felekoglu, 2005 ; Özogul et al., 2004 ; Mendes et al., 2008). La composition chimique de la chair de poisson varie considérablement non seulement au sein de la même espèce, mais aussi au sein de chaque poisson en fonction de la nutrition, de l'habitat, de la taille de poisson, de la saison de pêche, des techniques de pêche, des variations saisonnières et sexuelles, ainsi que des autres conditions environnementales (Pacheco-Aguilar et al., 2000). La variation de la composition chimique, en raison des facteurs cités ci-dessus, pourrait conduire à des changements dans les caractères organoleptiques, y compris le goût, l'odeur, la texture, la couleur et l'aspect de surface, qui contrôlent l'acceptabilité du poisson en tant qu'aliment (Flick et Martin, 1992 ; Love, 1970).

Tableau n° 6: La composition chimique de la sardine fraîche ^a

Composition globale	% Moyenne	Ecart type
Protéines	19.18	0.01
Lipides	9.6	0.11
Humidité	69.59	0.71
Cendres	1.63	0.34

^a Les résultats sont calculés à partir des trois répétitions (n=3).

3.3. Appréciation organoleptique

Les changements de la qualité organoleptique des filets de sardine crue emballés sous vide (VP) sont présentés dans la figure n° 11. Le score sensoriel (points de défauts) de poisson cru est augmenté avec le temps de stockage dans tous les groupes conservés sous réfrigération. Les résultats obtenus indiquent des différences significatives entre les groupes traités et le témoin ($P < 0.05$) aux 10, 14 et 17 jours de stockage. Il est à noter que l'utilisation des extraits d'artémisia et de menthe comme des conservateurs "naturels" n'a pas eu d'effet sur l'odeur naturelle initiale et la texture des filets de sardine stockées en VP. La limite d'acceptabilité de sardine, basé sur l'évaluation sensorielle, est de 10 jours pour le témoin (VC) et 17 jours pour les groupes VM et VA. L'application de 1% d'artémisia ou de menthe dans le poisson en combinaison avec l'emballage sous vide fournit une plus longue durée de vie par rapport au témoin. Lorsque le poisson est rejeté par le panel d'évaluation sensorielle, les points de défauts de filets crus sont de 6.2 pour le témoin, 6.7 pour le groupe VA et 7.5 pour le groupe VM. Özogul et al. (2004) ont rapporté une durée de vie de 9 jours pour la sardine emballée sous vide et stockée à 4°C. Dans des études similaires, se basant sur l'évaluation sensorielle, une durée de vie plus courte (12 jours) est observée dans la sardine emballée sous vide et traitée par 1 % et 5% de zéolite (Kuley et al., 2012), tandis que Kenar et al. (2010) ont rapporté une durée de vie plus longue (20 jours) pour la sardine emballée sous vide et traitée par 1% de romarin et 1% de sauge. Des durées de vie de 17 et de 23 jours ont été rapportées par Atrea et al. (2009) pour les poulpes frais traités par 0.2 et 0.4% d'huile d'origan et conservés en emballage VP, respectivement. Mahmoud et al. (2004) ont montré que l'addition de 1% de carvacrol et 1% de thymol prolongeait la durée conservation de filets de carpes de 8 jours à 5 °C.

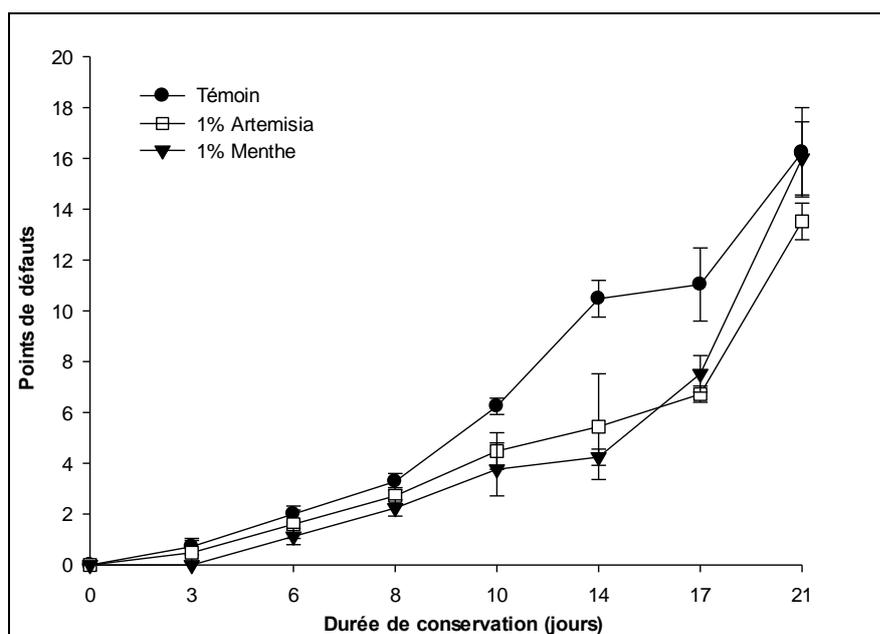


Figure n° 11. Les changements dans la qualité organoleptique (points de défauts) des filets de sardine crue durant le stockage à 3 ± 1 °C en emballage sous vide sans extrait (VC, groupe témoin), en emballage sous vide avec l'extrait d'artémisia 1% (VA) et en emballage sous vide avec l'extrait de menthe 1% (VM).

Le score sensoriel de la sardine cuite stockée en VP est diminué au cours de la durée de conservation (cf. figure n° 12). Les résultats de la présente étude montrent une différence significative entre les groupes traités et le témoin ($P < 0.05$) après 3 jours de conservation à 3 ± 1 °C (sauf pour le 21^{ème} jour). Il est intéressant de noter que les échantillons traités par les extraits de plantes sont fortement préférés par le panel d'évaluation sensorielle en raison de leur odeur et saveur recherchées, caractéristique du poisson frais, après avoir obtenus les scores d'acceptabilité les plus élevés. Un mauvais goût et une mauvaise odeur du témoin et des groupes traités ne sont détectés qu'à partir du 10^{ème} et du 17^{ème} jour de stockage réfrigéré, respectivement. Aux temps de rejet organoleptique du poisson cru, les scores d'acceptabilité générale enregistrés pour la sardine cuite sont de 5.9 pour le témoin, 4.1 pour le groupe VA et 3.4 pour le groupe VM.

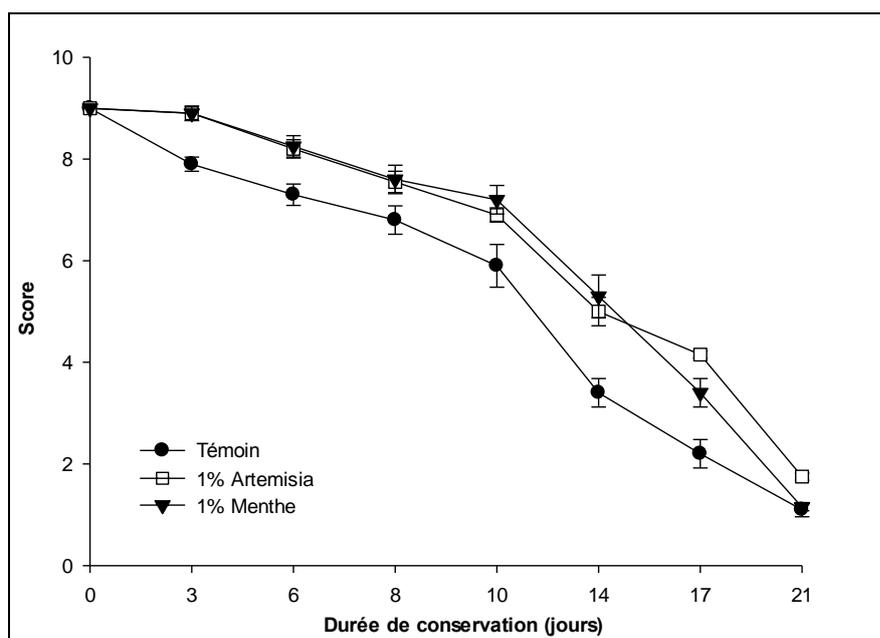


Figure n° 12. Les changements sensoriels (score) des filets de sardine cuite durant le stockage à 3 ± 1 °C en emballage sous vide sans extrait (VC, groupe témoin), en emballage sous vide avec l'extrait d'artémisia 1% (VA) et en emballage sous vide avec l'extrait de menthe 1% (VM).

3.4. Analyses physico-chimiques

Le tableau n° 7 regroupe les valeurs de pH, d'ABVT (mg/100 g), de SR-TBA (mg malonaldéhyde /kg), de PV (mEq/kg) et d'AGL (% d'acide oléique) enregistrées dans les filets de sardine durant le stockage à 3 ± 1 °C en emballage sous vide.

L'évolution des valeurs de pH des filets de sardine conservés en emballage sous vide est présentée dans le tableau n° 7. Le pH initial des échantillons de sardine est de 6.40 et augmente légèrement dans tous les groupes au cours de la période de conservation. Une telle augmentation a été rapportée par Erkan et al. (2010) et Goulas et Kontominas (2007), et qui peut être attribuée à une accumulation de composés alcalins d'origine microbienne, principalement l'ammoniac lors de l'altération de la chair de poisson. Il est important de noter qu'aucune différence significative dans le pH n'a été observée entre les groupes testés ($P > 0.05$) durant la période de stockage réfrigéré. Au temps de rejet organoleptique, les valeurs finales de pH enregistrées sont de 6.83, 6.93 et 6.87 pour les groupes VC, VA et VM, respectivement.

L'ABVT est le produit de l'altération bactérienne et de l'action des enzymes endogènes, et sa teneur est souvent utilisée comme un indice pour évaluer la qualité de conservation et la durée de vie des poissons (EEC, 1995). Les changements des valeurs de l'ABVT dans les filets de sardine réfrigérés (3 ± 1 °C) sous vide sont présentés dans le tableau n° 7. La valeur initiale de l'ABVT enregistrée est de 16.70 mg/100 g, ce qui est remarquablement similaire aux résultats rapportés par Kuley et al. (2012), et inférieure aux résultats enregistrés par Kenar et al. (2010) dans les sardines entreposées à basse température. De légères différences dans les teneurs en ABVT pourraient être liées à la teneur en azote non protéique, qui à son tour dépend du type d'alimentation, de la saison de capture, de la taille de poisson, et de divers facteurs environnementaux, ainsi que de la qualité microbiologique initiale des tissus de poisson (Özogul et al., 2004).

Tableau n° 7 : Changements de pH, ABVT (mg/100 g), SR-TBA (mg malonaldéhyde /kg), PV (mEq/kg) et AGL (% d'acide oléique) dans les filets de sardine durant le stockage à 3±1 °C en emballage sous vide sans extrait (VC, groupe témoin), en emballage sous vide avec l'extrait d'artémisia 1% (VA) et en emballage sous vide avec l'extrait de menthe 1% (VM).

Jours	pH	ABVT	SR-TBA	PV	AGL	Groupes
0	6.40±0.45 ^x	16.70±0.04	0.56±0.09	5.17±1.47	2.36±0.42	VC
3	6.88±0.01 ^a	16.60±0.08 ^a	0.95±0.17 ^a	5.09±1,23 ^a	3.61±1.80 ^a	VC
	6.93±0.07 ^a	16.10±0.79 ^a	0.44±0.10 ^b	5.00±1,65 ^a	2.60±1.79 ^a	VA
	6.97±0.07 ^a	16.09±0.95 ^a	0.53±0.18 ^b	5.08±0,69 ^a	2.85±1.23 ^a	VM
6	6.91±0.07 ^a	23.82±1.55 ^a	0.73±0.10 ^a	7.37±1.06 ^a	4.06±1.18 ^a	VC
	6.93±0.04 ^a	19.19±2.32 ^b	0.50±0.12 ^b	7.29±1.23 ^a	2.82±1.61 ^a	VA
	6.98±0.02 ^a	20.50±1.46 ^{ab}	0.49±0.11 ^b	7.26±0.93 ^a	3.51±1.40 ^a	VM
8	6.94±0.08 ^a	31.04±3.03 ^a	0.51±0.02 ^a	9.66±0.89 ^a	4.51±0.56 ^a	VC
	6.93±0.01 ^a	22.29±3.85 ^b	0.49±0.01 ^a	9.59±0.82 ^a	3.05±1.43 ^a	VA
	6.99±0.01 ^a	24.90±1.97 ^b	0.44±0.02 ^b	9.44±1.17 ^a	4.17±1.00 ^a	VM
10	6.83±0.11 ^b	31.45±0.01 ^a	0.61±0.03 ^a	19.80±2.98 ^a	5.07±0.10 ^a	VC
	7.08±0.01 ^a	24.90±2.04 ^b	0.56±0.15 ^{ab}	16.31±3.47 ^a	4.23±2.26 ^a	VA
	7.05±0.02 ^a	30.40±0.40 ^a	0.42±0.03 ^b	17.22±1.72 ^a	5.94±0.81 ^a	VM
14	6.83±0.01 ^a	35.04±1.10 ^a	0.47±0.02 ^b	21.56±0.19 ^a	7.12±1.80 ^a	VC
	6.91±0.07 ^a	27.44±1.93 ^c	0.86±0.22 ^a	17.54±2.96 ^a	5.59±2.14 ^a	VA
	6.88±0.11 ^a	30.60±0.03 ^b	0.39±0.03 ^b	19.12±2.44 ^a	6.13±0.31 ^a	VM
17	6.71±0.01 ^b	47.22±1.66 ^a	0.52±0.01 ^a	23.81±0.29 ^a	7.44±1.05 ^a	VC
	6.93±0.10 ^a	29.32±2.74 ^b	0.60±0.08 ^a	16.28±4.78 ^a	5.92±2.88 ^a	VA
	6.87±0.15 ^{ab}	33.21±2.27 ^b	0.31±0.06 ^b	27.27±6.00 ^a	7.08±1.70 ^a	VM
21	7.08±0.16 ^a	52.89±4.80 ^a	0.59±0.04 ^a	28.76±2.18 ^a	8.93±0.51 ^a	VC
	7.03±0.01 ^a	37.27±3.05 ^b	0.56±0.08 ^a	25.17±1.70 ^a	6.32±1.26 ^b	VA
	6.99±0.04 ^a	40.90±5.08 ^b	0.39±0.02 ^b	28.79±2.88 ^a	7.24±1.59 ^{ab}	VM

^x Moyenne ± écart-type (n = 3). Les différentes lettres minuscules (^{a-c}) dans une rangée indiquent des différences significatives (P < 0.05) entre les groupes.

Les niveaux de l'ABVT des échantillons de sardines augmentent progressivement dans tous les groupes emballés sous vide tout au long du stockage réfrigéré. En effet, l'analyse statistique montre qu'il existe des différences significatives (P < 0.05) entre le témoin et le groupe VA après 6 jours de conservation, dont les valeurs minimales sont enregistrées pour les échantillons traités par 1% d'artémisia (VA) jusqu'à 17 jours de conservation (cf. tableau n° 7). Ces résultats montrent que les propriétés antimicrobiennes des composés phénoliques présents dans l'extrait *A. campestris* ont joué un rôle clé dans le

maintien des valeurs de l'ABVT à de faibles niveaux dans les filets de sardine emballés sous vide au cours de l'entreposage à 3 ± 1 °C. Özogul et al. (2004) ont constaté que la libération des bases volatiles totales augmente jusqu'à 15 mg/100 g pour la sardine conservée à l'air libre, 19 mg/100 g pour la sardine emballée sous vide (VP) et 17 mg/100 g pour la sardine emballée sous atmosphère modifiée (MAP) dans les derniers jours de l'acceptabilité organoleptique. Cependant, dans la présente étude, les teneurs en ABVT les plus élevées pour les groupes traités sont enregistrées au temps de rejet organoleptique, correspondant aux valeurs de 29.32 mg/100 g pour le groupe VA et 33.21 mg/100 g pour le groupe VM. Il faut bien noter que ces teneurs sont aux limites d'acceptabilité recommandées par la Communauté Européenne (25 à 35 mg de N par 100 g) pour les produits de la pêche (EEC, 1995). Ces résultats concordent avec le retard de croissance bactérienne dans les groupes traités, où les charges dénombrées dans le groupe VA sont significativement ($P < 0.05$) plus faibles que le témoin après 6 jours de conservation (cf. tableau n° 9), résultant des bonnes teneurs en composés phénoliques et flavonoïdes dans l'extrait d'artémisia qui possèdent une forte activité antimicrobienne. Dans une étude similaire, le niveau initial de l'ABVT est de 21.34 mg/100 g dans les filets de sardine emballés sous vide à 3 ± 1 °C, et les teneurs les plus faibles en ABVT sont notées au temps de rejet organoleptique dans les groupes traités par les extraits de romarin et de sauge, correspondant aux valeurs de 29.26 et 31.04 mg/100 g, respectivement (Kenar et al., 2010). Kuley et al. (2012) ont constaté que l'application de zéolite dans la sardine emballée sous vide entraîne une réduction significative de l'ABVT, sauf pour les groupes traités par 5% de zéolite au 15^{ème} jour de conservation. Les niveaux de l'ABVT de filets de carpe traités (carvacrol 0.5% et thymol 0.5%) atteignent une valeur de 30 mg/100 g après 12 jours, alors que le témoin atteint cette limite après 4 jours à 5 °C (Mahmoud et al., 2004).

L'indice de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (SR-TBA) représente le degré de rancidité des produits alimentaires. Il est utilisé comme une mesure de la teneur en malonaldéhyde (MDA), un produit secondaire d'oxydation résultant de la dégradation des hydroperoxydes lipidiques formés pendant le procédé d'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI), afin de déterminer la qualité du poisson, en particulier les poissons gras comme la sardine (Mendes et al., 2008).

Le tableau n° 7 montre l'évolution de SR-TBA au cours de l'entreposage des filets de sardine en emballage sous vide (VP) à 3 ± 1 °C. La valeur initiale de SR-TBA enregistrée est de 0.56 mg de malonaldéhyde/kg de muscle, et ses niveaux fluctuent de 0.31 à 0.53 mg de malonaldéhyde/kg pour le groupe VM et de 0.44 à 0.86 mg de malonaldéhyde/kg pour le groupe VA. La concentration de SR-TBA dans le poisson fraîchement pêché est généralement comprise entre 3 et 5 mg de malonaldéhyde (MDA) par kilogramme de chair, mais les niveaux de 5-8 mg MDA/kg de chair sont considérés comme la limite d'acceptabilité pour les poissons stockés dans la glace (Beltran et Moral, 1990 ; Nunes et al., 1992). Les résultats de la présente étude montrent que les valeurs SR-TBA de la sardine traitée par l'extrait de menthe (VM) sont significativement ($P < 0.05$) inférieures à ceux du témoin, à l'exception du 14^{ème} jour (cf. tableau n° 7). Il est à noter que l'addition de 1% d'extrait de menthe a réduit efficacement les valeurs SR-TBA dans le muscle de poisson, ce qui retarda l'oxydation des lipides et prolongea la durée de conservation du produit. Kanatt et al. (2007) ont signalé que l'extrait de *M. spicata* retarde l'oxydation des lipides, contrôlé par le SR-TBA, dans la viande d'agneau irradiée et conservée au froid, et que ses valeurs sont significativement plus faibles ($P < 0.05$) par rapport aux échantillons sans extrait de menthe, en raison de la bonne teneur de l'extrait de menthe en phénols totaux et en flavonoïdes. Les principaux acides phénoliques présents dans l'extrait de *Mentha spicata* soluble dans l'eau sont l'eriocitrin, la lutéoline-glucoside, l'acide rosmarinique et l'acide caféique (Dorman et al., 2003b).

L'indice de peroxyde (PV) est la mesure des principaux produits de l'oxydation des lipides, qui se décomposent en produits secondaires ou réagissent avec des protéines. L'augmentation du PV est plus utile comme un indice des premiers stades de l'oxydation des lipides; quand l'oxydation se produit, le PV peut commencer à baisser (Melton, 1983 ; Aubourg et al., 2004). La valeur initiale moyenne (J0) en PV est de 5.17 mEq/kg de muscle. Lors de la réfrigération, ses teneurs augmentent pour atteindre au terme d'entreposage (J17) les valeurs de 16.28 ± 4.78 et 27.27 ± 6.00 mEq/kg respectivement pour les groupes VA et VM. Ces résultats montrent que l'utilisation des extraits de plantes (*Mentha spicata* et *Artemisia campestris*) associée avec les conditions d'emballage sous vide (VP) n'a pas eu d'effet significatif ($P > 0.05$) sur la réduction de PV au cours du stockage réfrigéré (cf. tableau n° 7).

Smith et al. (1980) et Cho et al. (1989) ont constaté que les valeurs initiales du PV sont de 0.8 à 1.2 pour le hareng et 27.6 pour la sardine fraîche, respectivement. Cependant, Connell (1975) a noté que le poisson peut présenter l'odeur et le goût de rance si les valeurs de peroxyde se situent entre 10 à 20 mEq/kg. Dans la présente étude, l'indice de peroxyde dans tous les groupes est resté en dessous de 10 mEq/kg et ce jusqu'à 8 jours de conservation (cf. tableau n° 7). Les peroxydes sont instables et sont rapidement transformés en produits secondaires d'oxydation telle que le SR-TBA. Les résultats obtenus montrent que les valeurs de PV augmentent dans tous les groupes, alors que SR-TBA diminuait dans la sardine traitée par l'extrait de menthe (groupe VM) après 8 jours de conservation. Cela est probablement dû à l'activité antioxydante des acides phénoliques présents dans l'extrait de menthe, qui inhibent la transformation des hydroperoxydes lipidiques en SR-TBA pendant le processus d'oxydation des acides gras polyinsaturés. Dans les stades post-mortem, les antioxydants endogènes du muscle de poisson sont consommés successivement pour inhiber l'oxydation des lipides ou ils peuvent être perdus au cours du processus de transformation tels que le lavage ou le filetage. Leur perte provoque une augmentation rapide de la vitesse d'oxydation à la fin de la période d'induction (Jacobsen et al., 2008). L'activation de l'hémoglobine est également considérée comme un catalyseur majeur de l'oxydation des lipides dans le muscle de plusieurs espèces de poissons (Richards et al., 2002). Sur la base de ces résultats, il peut donc être conclu que la stabilité du produit à l'oxydation des lipides dépend non seulement des propriétés barrières à l'O₂ des sacs en polyéthylène utilisés dans l'emballage, mais aussi de l'activité antioxydante des acides phénoliques naturellement présents dans l'extrait de menthe, ce qui peut retarder la perte des antioxydants endogènes du muscle de poisson et inhiber l'auto-oxydation de l'hémoglobine pendant l'entreposage frigorifique.

La dégradation des lipides limite la durée de vie des poissons gras comme la sardine, le maquereau, l'anguille et le hareng (Hamre et al., 2003 ; Morzel et Van de Vis, 2003). Des glycérides, des glycolipides et des phospholipides sont hydrolysés par les lipases en acides gras libres (AGL), qui sont ensuite soumis à une oxydation pour produire des composés de faible poids moléculaire, tels que les aldéhydes et les cétones. Ces composés sont responsables de mauvais goût, de mauvaise odeur et de goût du poisson (Özogul et al., 2005).

Au cours du stockage réfrigéré, la valeur initiale des AGL enregistrée est de 2.36 % d'acide oléique. L'analyse statistique montre qu'il n'existe pas de différences significatives dans les valeurs des AGL ($P > 0.05$) entre le témoin et les groupes traités durant l'entreposage sous vide à $3 \pm 1^\circ\text{C}$ (cf. tableau n° 7). Ces observations sont en accord avec les résultats obtenus par Kenar et al. (2010) et Kuley et al. (2012) sur des sardines (*Sardina pilchardus*). Ces auteurs ont signalé qu'aucune différence significative n'a été observée ($P > 0.05$) dans les valeurs des AGL entre le témoin et les groupes traités par les extraits de plantes (extraits de romarin et de sauge) et la zéolite naturelle (1 et 5%), respectivement. Il est bien connu que les acides gras libres (AGL) sont le résultat de l'hydrolyse enzymatique des lipides estérifiés. Ces composés sont également impliqués dans des réactions avec des protéines myofibrillaires qui favorisent l'agrégation de protéines (Pacheco-Aguilar et al., 2000). Il est important de noter que la valeur la plus basse des AGL (5.92 % d'acide oléique) est trouvée dans les échantillons de sardine traités par l'extrait d'artémisia (VA) au temps de rejet organoleptique. Cette diminution pourrait être liée à l'effet inhibiteur de composés phénoliques présents dans l'extrait d'artémisia sur l'hydrolyse enzymatique libérant AGL.

La teneur en amines biogènes du poisson dépend de nombreux facteurs, y compris l'espèce de poissons, la teneur en acides aminés libres et la flore spécifique. Le tableau n° 8 montre les variations de l'ammoniac et des amines biogènes dans les filets de sardine réfrigérés ($3 \pm 1^\circ\text{C}$) sous vide. La valeur initiale d'ammoniac est de 16.68 mg/100 g et atteint 138.94 mg/100 g pour le groupe VC, 142.20 mg/100 g pour le groupe VA et 150.37 mg/100 g pour le groupe VM à la limite de l'acceptabilité de la sardine. Les résultats de la présente étude montrent des différences significatives dans la teneur en ammoniac entre les groupes traités et le témoin ($P < 0.05$) aux jours 8, 10, et 14. Il est à noter que l'utilisation de 1% d'extrait d'artémisia ou de menthe n'a pas inhibé l'accumulation de l'ammoniac dans la sardine emballée sous vide pendant l'entreposage frigorifique. Cependant, Pérez-Villarreal et al. (2008) ont rapporté que l'ammoniac est présent dans le poisson fraîchement pêché. Pendant l'entreposage frigorifique, il est formé par des enzymes endogènes et bactériennes. Il est un mauvais indicateur de la fraîcheur du poisson et il ne peut pas être considéré comme un indicateur efficace de l'altération du poisson.

Dans des études similaires, Kuley et al. (2012) ont trouvé que l'application de la zéolite entraîne une réduction significative de l'accumulation d'ammoniac dans le muscle de sardine, dont le traitement par une dose de 5% de zéolite est plus efficace pour supprimer la formation d'ammoniac au début du stockage par rapport au groupe traité par 1% de zéolite. De même, Özogul et al. (2011) ont rapporté que l'addition d'antioxydants naturels de romarin et de sauge aboutit à une faible accumulation de l'ammoniac dans le muscle de sardine.

Dans cette expérimentation, les principales amines biogènes formées dans les filets de sardine sont la putrescine, la cadaverine et la dopamine. Gokoglu et al. (2004) ont constaté que l'amine principale formée dans des échantillons de sardine est la putrescine. Elle atteint un niveau maximal de 30.34 mg/100 g à 4 °C, alors que la formation de cadaverine n'a pas changé de manière significative au cours de l'entreposage à 4 °C. Concernant la putrescine, la teneur initiale enregistrée est de 3.23 mg/100 g et augmente progressivement dans tous les groupes après 6 jours de conservation à 3 ± 1 °C sous vide. En effet, les résultats obtenus indiquent des différences significatives entre le témoin et les groupes traités aux jours 6, 8 et 14 ($P < 0.05$), dont les valeurs de putrescine les plus faibles sont enregistrées pour les échantillons de sardine traités par 1% de menthe (cf. tableau n° 8). Peu d'études ont investigué l'effet d'extraits de plantes sur la formation des amines biogènes dans le poisson. Özogul et Özogul (2006) ont rapporté que la concentration de la putrescine augmente au cours des périodes de l'entreposage de la sardine à l'air, en VP et en MAP atteignant leur maximum de 12.2 mg/100 g à 12 jours, 7.59 mg/100 g à 10 jours et 5.83 mg/100 g à 10 jours, respectivement. Au temps de rejet organoleptique, des teneurs plus faibles en putrescine et en cadaverine sont trouvées dans la sardine traitée par les extraits de romarin et de sauge et qui sont 100 fois inférieurs à ceux de témoin (Özogul et al., 2011). Cependant, une nette augmentation de la production de putrescine est notée pour tous les groupes testés durant le stockage réfrigéré, atteignant des teneurs maximales de 136.39 et 158.10 mg/100 g au 17^e jour pour les groupes VM et VA, respectivement (cf. tableau n° 8). Par conséquent, l'addition d'extraits naturels n'a pas eu d'effet inhibiteur sur l'accumulation de putrescine dans les filets de sardine emballés sous vide au cours de l'entreposage réfrigéré.

Pour la cadaverine, la valeur initiale enregistrée à J 0 est de 2.38 mg/100 g de muscle, mais ses teneurs n'augmentent rapidement qu'à partir du 14^{ème} jour pour tous les groupes conservés en VP à 3 ± 1 °C (cf. tableau n° 8). La cadaverine commence généralement à augmenter plus tard que la putrescine, mais ses niveaux à la fin de l'entreposage sont généralement plus élevés (Baixas-Nogueras et al., 2002). Dans la présente étude, la combinaison de l'emballage VP avec 1% d'extrait de menthe (VM) aboutit à une accumulation plus faible de la cadaverine dans le muscle de poisson (à l'exception de 10^{ème} jour), et atteint un maximum de 55.13 mg/100 g au temps de rejet organoleptique. Par contre, aucune réduction significative de la teneur en cadaverine n'a été observée dans les groupes traités par 1% d'extrait d'artémisia (VA) après 17 jours de conservation. Dorman et al. (2003b) ont rapporté que les principaux acides phénoliques rapportés dans l'extrait soluble dans l'eau de *Mentha spicata* sont l'eriocitrin, la lutéoline-glucoside, l'acide rosmarinique et l'acide caféique. Les résultats obtenus dans cette étude pourraient être liés à l'activité antimicrobienne des acides phénoliques naturellement présents dans l'extrait de menthe, ce qui peut réduire l'accumulation de cadaverine dans le muscle de poisson pendant l'entreposage frigorifique. Kuley et al. (2012) ont constaté que l'utilisation de zéolite réduit l'accumulation de putrescine et de cadaverine (sauf pour J 15) dans le muscle de poisson pendant la période de conservation sous réfrigération. Rodriguez et al. (1999) ont proposé d'utiliser ces amines pour indiquer la fraîcheur de la truite arc-en-ciel de l'eau douce stockée à l'air ou en emballage sous vide.

La spermidine et la spermine sont des amines biogènes naturellement produites dans les aliments (Veciana-Noguès et al., 1996), et leur concentration dans les muscles frais est inférieure à 1 mg/100 g de muscle, mais elle dépend des espèces de poissons, des acides aminés libres présents dans les tissus et des conditions d'exposition à des bactéries d'altération (Mackie et al., 1997). Les niveaux de spermidine et de spermine de filets de sardines sont présentés dans le tableau n° 8. Les valeurs initiales de spermidine et de spermine sont de 11.65 et 9.31 mg/100 g de muscle, respectivement, et leurs concentrations fluctuent au cours de la conservation en VP. Des teneurs initiales similaires en spermidine et en spermine ont été signalées par Özogul et al. (2011) pour les filets de sardine (*S. pilchardus*) traités par la poudre de romarin et de sauge.

Le stockage sous glace inhibe la formation de ces deux amines dans la sardine, par contre, dans des conditions de stockage à la température ambiante, les teneurs en spermine et en spermidine augmentent et atteignent les valeurs de 5 et 6 mg/100 g de muscle au bout de 24 h, respectivement (Ababouch et al., 1996). Dans la présente étude, l'utilisation de 1% d'extrait de menthe a un effet significatif sur la réduction du niveau de la spermidine initial dans le muscle de poisson après 14 jours de conservation, tandis que l'application de deux extraits n'a pas eu d'effet significatif sur l'accumulation de spermine comparé au groupe témoin (cf. tableau n° 8). Kuley et al. (2012) ont rapporté que la zéolite a généralement un effet significatif sur la réduction de la spermidine initiale et sur l'accumulation de spermine dans le muscle de poisson, mais l'application de la zéolite à une dose de 1% conduit à une forte accumulation de spermine dans la sardine après 4 jours de conservation.

Table n° 8 Changements d'ammoniac et d'amines biogènes dans les filets de sardine durant le stockage à 3±1 °C en emballage sous vide sans extrait (VC, groupe témoin), en emballage sous vide avec l'extrait d'artémisia 1% (VA) et en emballage sous vide avec l'extrait de menthe 1% (VM).

Jours	AMN	PUT	CAD	SPD	TRP	PHEN	SPN	HIS	SER	TYR	TMA	DOP	AGM	Groupes
0	16.68±1.22 ^x	3.23±0.31	2.38±0.17	11.65±0.89	ND	ND	9.31±0.41	0.84±0.04	7.46±0.67	7.38±0.71	ND	26.40±2.43	1.31±0.07	VC
3	22.89±2.17 ^b	0.56±0.04 ^c	1.86±0.10 ^c	13.35±1.26 ^c	1.27±0.03 ^b	ND	14.50±0.86 ^b	0.46±0.07 ^a	43.08±2.72 ^b	0.96±0.09 ^b	ND	53.95±4.04 ^b	11.05±0.24 ^a	VC
	41.24±4.03 ^a	3.41±0.26 ^a	2.45±0.20 ^b	22.01±1.74 ^a	1.74±0.14 ^a	ND	15.83±0.82 ^{ab}	0.57±0.05 ^a	54.14±2.79 ^a	1.66±0.14 ^a	ND	75.20±2.44 ^a	9.07±0.92 ^b	VM
	37.92±2.78 ^a	1.34±0.06 ^b	3.92±0.39 ^a	17.03±0.70 ^b	1.18±0.09 ^b	ND	16.87±0.61 ^a	0.54±0.05 ^a	22.38±1.34 ^c	0.85±0.07 ^b	ND	55.22±2.77 ^b	4.07±0.28 ^c	VA
6	84.12±6.39 ^a	32.76±1.65 ^a	9.61±0.84 ^a	18.15±0.74 ^b	15.67±0.19 ^a	ND	12.40±0.84 ^b	2.85±0.24 ^a	25.12±1.67 ^b	3.15±0.18 ^a	ND	61.32±3.60 ^a	8.65±0.34 ^a	VC
	67.90±3.30 ^b	15.60±0.58 ^c	4.58±1.26 ^b	20.65±1.19 ^a	1.47±0.15 ^c	ND	15.78±0.72 ^a	1.19±0.06 ^c	28.43±1.48 ^a	2.76±0.20 ^b	ND	57.41±2.42 ^a	5.23±0.41 ^c	VM
	82.41±4.72 ^a	28.02±2.62 ^b	6.40±0.62 ^b	19.61±1.20 ^{ab}	6.15±0.49 ^b	ND	12.12±0.50 ^b	1.90±0.12 ^b	12.38±0.81 ^c	2.51±0.06 ^b	ND	60.06±2.75 ^a	7.15±0.64 ^b	VA
8	145.35±10.61 ^a	64.97±3.27 ^a	17.36±1.58 ^a	22.96±0.22 ^a	30.07±0.35 ^a	ND	10.29±0.83 ^b	5.25±0.41 ^a	7.16±0.63 ^a	5.34±0.27 ^a	ND	68.69±3.17 ^a	6.26±0.44 ^a	VC
	94.57±2.58 ^c	27.78±0.90 ^c	6.71±2.33 ^b	19.28±0.64 ^b	1.21±0.14 ^c	ND	15.73±0.62 ^a	1.81±0.06 ^c	2.71±0.17 ^b	3.86±0.26 ^b	ND	59.59±2.07 ^b	6.39±0.54 ^a	VM
	126.90±6.66 ^b	54.70±5.17 ^b	8.89±0.85 ^b	22.19±1.71 ^a	11.12±0.89 ^b	ND	7.38±0.38 ^c	3.25±0.20 ^b	2.28±0.29 ^b	4.18±0.07 ^b	ND	44.93±3.06 ^c	5.23±0.37 ^b	VA
10	138.94±7.89 ^a	30.93±1.14 ^c	3.91±0.33 ^c	4.30±0.34 ^c	2.46±0.18 ^b	0.54±0.02 ^b	4.24±0.29 ^c	1.43±0.14 ^c	1.97±0.07 ^c	1.30±0.06 ^c	ND	50.20±0.94 ^b	9.51±0.39 ^c	VC
	118.83±3.52 ^b	196.49±5.83 ^a	29.60±1.38 ^a	19.93±1.16 ^a	3.50±0.18 ^a	0.85±0.07 ^a	20.92±1.01 ^a	3.04±0.05 ^b	31.74±3.11 ^a	1.92±0.03 ^a	ND	50.00±2.36 ^b	16.99±1.14 ^a	VM
	122.17±11.08 ^b	111.61±5.52 ^b	11.06±0.30 ^b	11.39±0.55 ^b	1.26±0.12 ^c	ND	10.58±0.66 ^b	3.81±0.37 ^a	19.32±0.97 ^b	1.58±0.09 ^b	ND	68.00±5.31 ^a	11.27±0.12 ^b	VA
14	241.93±18.48 ^a	204.70±15.61 ^a	108.73±10.41 ^a	17.83±0.55 ^a	9.68±0.43 ^a	ND	10.04±0.27 ^b	7.72±0.74 ^a	4.81±0.29 ^a	15.80±1.38 ^a	3.00±0.09 ^a	36.03±2.22 ^a	9.33±0.44 ^a	VC
	140.54±13.72 ^b	83.09±2.16 ^c	29.51±2.96 ^b	9.78±0.62 ^c	10.34±0.90 ^a	ND	7.05±0.10 ^c	4.33±0.19 ^b	2.02±0.20 ^a	4.16±0.21 ^c	1.57±0.08 ^b	23.56±1.50 ^b	4.30±0.36 ^b	VM
	149.43±14.84 ^b	145.19±11.46 ^b	37.76±2.92 ^b	12.42±0.63 ^b	4.50±0.49 ^b	ND	11.71±0.57 ^a	4.44±0.64 ^b	5.01±2.53 ^a	12.25±1.15 ^b	0.71±0.06 ^c	34.93±2.76 ^a	9.90±0.69 ^a	VA
17	154.39±5.72 ^a	119.30±0.95 ^b	91.54±1.78 ^a	7.85±0.06 ^c	6.00±1.05 ^b	0.72±0.02 ^b	10.98±2.72 ^a	18.33±0.57 ^a	1.14±0.02 ^c	27.28±1.69 ^a	1.40±0.09 ^b	50.03±3.74 ^a	4.51±0.16 ^c	VC
	150.37±8.86 ^a	136.39±9.09 ^b	55.13±4.89 ^b	12.53±0.48 ^b	9.09±0.52 ^a	1.92±0.15 ^a	11.73±0.85 ^a	5.68±0.36 ^b	3.35±0.24 ^b	24.59±0.78 ^b	3.12±0.10 ^a	31.81±2.31 ^b	14.79±0.42 ^a	VM
	142.20±10.86 ^a	158.10±13.33 ^a	57.17±3.81 ^b	14.43±0.51 ^a	6.49±0.23 ^b	ND	11.71±0.36 ^a	4.37±0.36 ^c	9.18±0.74 ^a	26.17±1.54 ^{ab}	1.00±0.05 ^c	31.38±0.92 ^b	10.45±0.46 ^b	VA
21	267.58±10.87 ^a	227.28±17.81 ^b	175.15±6.91 ^a	18.73±1.04 ^b	32.02±2.09 ^a	ND	11.33±0.98 ^b	33.86±3.34 ^a	8.00±0.65 ^a	33.03±2.98 ^a	1.32±0.05 ^c	78.73±6.37 ^b	10.86±0.91 ^a	VC
	187.01±36.04 ^b	122.79±8.54 ^c	71.52±5.99 ^c	13.72±0.42 ^c	3.70±0.08 ^c	5.24±0.24 ^a	11.49±0.47 ^b	11.40±0.64 ^c	2.16±0.24 ^c	17.78±1.26 ^b	2.19±0.15 ^b	20.68±0.86 ^c	9.90±0.29 ^a	VM
	264.04±10.97 ^a	312.68±15.13 ^a	117.99±6.11 ^b	23.50±1.57 ^a	27.46±1.22 ^b	5.59±0.41 ^a	17.99±0.70 ^a	15.02±0.35 ^b	6.67±0.40 ^b	13.76±0.98 ^c	4.94±0.11 ^a	89.82±2.22 ^a	10.92±0.60 ^a	VA

AMN, ammoniac; PUT, putrescine; CAD, cadaverine; SPD, spermidine; TRP, tryptamine; PHEN, 2-Phenyl-ethylamine; SPN, spermine; HIS, histamine; SER, serotonin; TYR, tyramine; TMA, trimethylamine; DOP, Dopamine. AGM, agmatine.

^x Moyenne (mg/100 g de muscle) ± écart-type (n = 3). ND : non détecté. Les différentes lettres minuscules (^{a-c}) dans une rangée indiquent des différences significatives (P <0.05) entre les groupes.

L'histamine est produite par la décarboxylation microbienne de l'acide aminé "histidine". L'importance de l'estimation de la concentration d'histamine dans les produits de la pêche est liée à son impact sur la santé humaine et la qualité des aliments (Özogul et al., 2004). Ababouch et al. (1991) ont rapporté que la sardine fraîche peut avoir des niveaux élevés d'histidine libre dans leur muscle ce qui la rend très sensible à la formation de l'histamine. La teneur initiale en histamine enregistrée est de 0.84 mg/100 g de muscle et augmente progressivement jusqu'à un maximum de 33.86 mg/100 g pour le groupe VC à la fin de la période de stockage (21 jours). En effet, l'analyse statistique montre qu'il existe des différences significatives ($P < 0.05$) dans les niveaux d'histamine entre les groupes traités et le témoin après 6 jours de stockage réfrigéré (cf. tableau n° 8). Mendes (2009) a rapporté que la production maximale de l'histamine est donc le résultat d'un compromis entre la production de l'histidine décarboxylase par des bactéries et la température optimale de l'activité de décarboxylation de l'acide aminé. El-Marrakchi et al. (1990) ont rapporté que la quantité d'histamine dans la chair de sardine (*S. pilchardus*) au moment du rejet (12 jours) sous glace est de 16.2 mg/100. Au 15^{ème} jour de stockage à 4 °C, les teneurs en histamine augmentent et atteignent des valeurs maximales de 20 mg/100 g pour la sardine stockée à l'air libre, 13 mg/100 g pour le groupe entreposé en VP et 10 mg/100 g pour le groupe entreposé en MAP (Özogul et al., 2004). Dans cette étude, les taux d'histamine les plus faibles sont observés pour les groupes VM et VA, correspondant aux valeurs de 11.40 et 15.02 mg/100 g à 21 jours de conservation, respectivement, donc en dessous du seuil critique de 20 mg/100 g fixé par l'Union européenne (EEC, 1996). De nombreuses études ont démontré que *Mentha spicata* et *Artemisia campestris* sont des sources riches en composés phénoliques et leurs extraits présentent une excellente activité antimicrobienne contre les bactéries pathogènes ou d'altération dans des milieux de laboratoire. Il faut également souligner que les propriétés antimicrobiennes des composés phénoliques présents dans les extraits de menthe et d'artémisia ont joué un rôle clé dans le maintien des niveaux d'histamine en dessous des limites critiques fixées par la réglementation européenne relative au commerce international des produits de la pêche. Les résultats de cette étude sont en accord avec ceux obtenus par Özogul et al. (2011) pour les filets de sardine traités par les extraits de romarin et de sauge. De même, Kuley et al. (2012) ont rapporté que l'utilisation de la zéolite réduit significativement l'accumulation de l'ammoniac et des amines biogènes, en particulier l'histamine et la tyramine.

D'autres amines biogènes qui peuvent agir comme potentiatrices de la toxicité de l'histamine sont la tyramine, la tryptamine, et la 2-phényléthylamine (Stratton et al., 1991). Ces amines ont des propriétés vaso-actives, et donc, leur présence dans les aliments doivent être surveillée (Mohan et al., 2009). À J0, la tryptamine n'est pas détectée dans le muscle de sardine, mais ses niveaux varient tout au long du stockage et atteignent un maximum de 32.02 mg/100 g pour le témoin à la fin de la période d'entreposage réfrigéré. Les résultats obtenus indiquent des différences significatives dans les teneurs en tryptamine entre les groupes traités et le témoin ($P < 0.05$) aux jours 6, 8 et 21. La triméthylamine et la 2-phényléthylamine présentent les teneurs les plus faibles dans la sardine, elles n'apparaissent qu'à partir du 14^{ème} et 10^{ème} jour, respectivement (cf. tableau n° 8).

La tyramine à des concentrations élevées peut provoquer une intoxication connue sous le nom de "réaction de fromage", qui présente des symptômes similaires à l'intoxication histaminique (Naila et al., 2010). La teneur initiale en tyramine relevée dans la chair de sardine est de 7.38 mg/100 g, puis diminue dans tous les groupes au début de la période d'entreposage. Cependant, une augmentation rapide du niveau de tyramine est observée après 14 jours de stockage réfrigéré. Elle atteint un niveau maximal de 33.03 mg/100 g pour les échantillons témoin à 21 jours de conservation (cf. tableau n° 8). Les niveaux de tyramine présentent des différences significatives entre les groupes traités et le témoin ($P < 0.05$) après 6 jours de stockage réfrigéré sous vide, à l'exception de 17 jours. Les faibles teneurs en tyramine sont enregistrés pour les groupes VM et VA, correspondant aux valeurs de 17.78 et 13.76 mg/100 g à la fin de la période de conservation, respectivement. Les résultats de la présente étude indiquent que la combinaison d'extraits naturels avec l'emballage sous vide réduit significativement l'accumulation de la tyramine dans le muscle de poisson. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Özogul et al. (2011) pour les filets de sardine traités par la poudre de romarin et de sauge. De plus, l'utilisation de la zéolite réduit significativement ($P < 0.05$) l'accumulation de l'ammoniac et des amines biogènes, en particulier l'histamine et la tyramine, où la concentration de 5% de zéolite est plus efficace que 1% pour réduire la teneur en tyramine dans le muscle de sardine (Kuley et al., 2012).

Au début de la période de conservation, le niveau de sérotonine augmente rapidement dans tous les groupes, puis commence à diminuer après 6 jours d'entreposage réfrigéré sous vide (cf. tableau n° 8). Il faut bien noter que l'efficacité de l'extrait de menthe sur

l'accumulation de la sérotonine est observée après 8 jours de conservation, à l'exception du 10^{ème} jour. Des résultats similaires ont été rapportés par Özogul et al. (2011) pour les filets de sardine traités par des extraits de plantes. Au début de la période de stockage, ces auteurs ont constaté que les concentrations de sérotonine augmentaient par l'addition d'extrait de romarin, tandis qu'une réduction significative est observée à la fin de la période de stockage. De plus, l'effet inhibiteur de la poudre de sauge est noté qu'à partir du 10^{ème} jour d'entreposage réfrigéré. Cependant, Kuley et al. (2012) ont rapporté que l'utilisation de la zéolite augmente les teneurs en sérotonine dans le muscle de sardine aux jours 4, 15 et 19.

Le tableau n° 8 montre les niveaux de dopamine et d'agmatine dans les échantillons de sardine conservés à 3±1 °C sous vide. Au cours de l'entreposage sous réfrigération, leurs concentrations fluctuent dans tous les groupes et la teneur en dopamine varie de 31.38 à 89.82 mg/100 g pour le groupe VA, tandis que l'agmatine s'accumule avec une valeur maximale de 16.99 mg/100 g pour le groupe VM au 10^{ème} jour de conservation. Il est à noter que la faible teneur en dopamine est observée dans les échantillons de sardine traités par 1% de menthe (VM) après 21 jours d'entreposage réfrigéré. Par la présence d'extraits de menthe et d'artémisia dans le muscle de sardine, des réductions significatives ($P < 0.05$) dans les teneurs en agmatine sont également observées jusqu'à 6 jours de stockage, puis elles commencent à augmenter dans les groupes traités et entreposés sous vide. Özogul et al. (2011) ont constaté que les valeurs d'agmatine sont significativement plus élevées dans les groupes traités par les extraits de romarin et de sauge, indiquant l'effet stimulant de ces extraits sur l'accumulation de l'agmatine. À la fin de la période de stockage, les concentrations d'agmatine enregistrées sont de 2.91 mg/100 g pour le groupe témoin, 22.38 mg/100 g pour le groupe traité par l'extrait de romarin et 14.17 mg/100 g pour le groupe traité par l'extrait de sauge. Veciana-Noguès et al. (1996) ont rapporté que la teneur en agmatine augmente au cours de la phase précoce de l'altération du poisson, mais elle diminue par la suite. Özogul et Özogul (2006) ont également noté que les teneurs en agmatine dans la sardine réfrigérée sous vide (VP) augmentent tout au long de la période de stockage et atteignent un maximum de 2.32 mg/100 g après 15 jours de conservation. Cependant, Özogul et al. (2008) ont rapporté que les niveaux de l'agmatine, la dopamine, et la sérotonine dans le mérrou blanc conservé à 4 °C sont au-dessous de 1 mg/100 g de muscle.

3.5. Analyses bactériologiques

L'évolution de la microflore des filets de sardine au cours de l'entreposage réfrigéré sous vide avec ou sans l'addition d'extraits de plantes est présentée dans le tableau n° 9 et les figures n° 11, 12, 13 et 14.

À J0, la charge initiale des germes aérobies totaux (APC) dénombrée est de 4.10 log UFC/g de muscle et augmente dans tous les groupes au cours de la conservation à 3±1 °C. En termes d'APC, l'ICMSF (1986) a établi un seuil de 7 log UFC/g comme une limite supérieure d'acceptabilité pour les espèces marines et d'eau douce ; cependant, cette limite est atteinte dans tous les groupes avant les temps de rejet organoleptique, au 8^{ème} jour pour le groupe VC et au 10^{ème} jour pour les groupes VA et VM (cf. figure n° 13). Özogul et al. (2004) ont signalé que l'évaluation sensorielle montre une durée de vie plus longue pour la sardine emballée sous vide (VP) et sous atmosphère modifiée (MAP) par rapport à l'évaluation microbiologique à 4 °C. Une flore totale (APC) similaire a été dénombrée par Kenar et al. (2010) dans la sardine à J0 (4.2 log UFC/g). El-Marrakchi et al. (1990) ont rapporté que la charge initiale d'APC de la sardine conservée sous glace est de 3.16×10^2 UFC/g et augmente pour atteindre les limites de 10^6 à 10^7 UFC/g au jour 9. Dans la présente étude, l'APC augmente progressivement pour atteindre un maximum de 7.93, 7.88 et 8.73 log UFC/g pour le témoin et les groupes VA et VM aux temps de rejet organoleptique, respectivement (cf. tableau n° 9). Kuley et al. (2012) ont constaté que l'APC initial de la sardine est de 3.53 log UFC/g (J0) et atteint des valeurs maximales de 9.71, 8.42 et 8.02 log UFC/g pour le témoin et les groupes traités par 1% et 5% de zéolite à la fin de la période de conservation, respectivement. Kenar et al. (2010) ont noté que la flore totale augmente plus rapidement dans le témoin que dans les groupes traités, indiquant l'efficacité des extraits de romarin et de sauge sur la croissance bactérienne dans les filets de sardine réfrigérés sous vide.

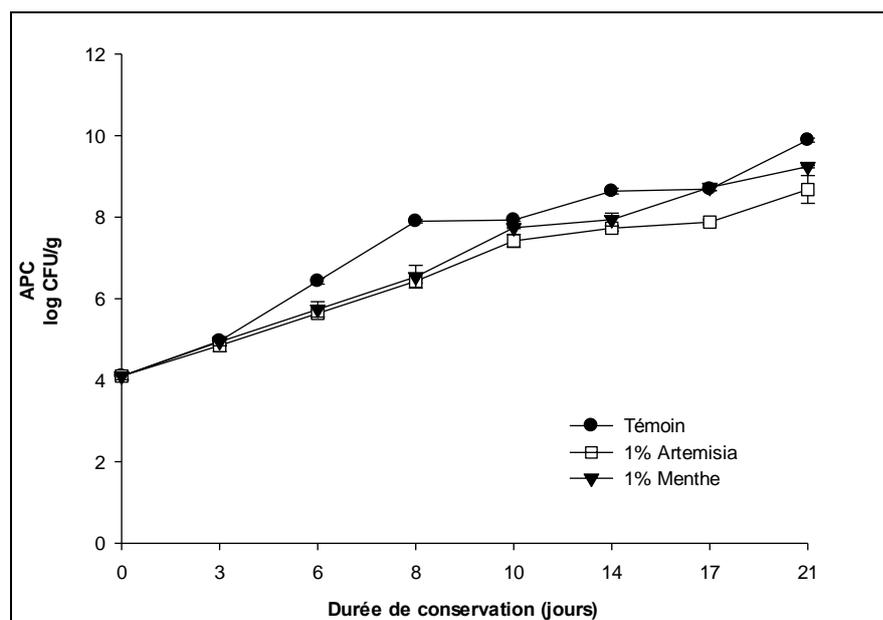


Figure n° 13 : Evolution des germes aérobies totaux (APC) au cours de l'entreposage des filets de sardine à 3 ± 1 °C en emballage sous vide sans extrait (VC, groupe témoin), en emballage sous vide avec l'extrait d'artémisia 1% (VA) et en emballage sous vide avec l'extrait de menthe 1% (VM).

L'analyse des coliformes est utilisée comme un indicateur de l'état hygiénique durant la transformation des aliments. La charge initiale des coliformes totaux (CC) est de 2.55 log UFC/g et augmente avec le temps de stockage dans tous les groupes (cf. figure n° 14). Aux différents temps de rejet organoleptique, les valeurs dénombrées sont de 6.66, 6.96 et 8.13 log UFC/g pour le témoin et les groupes VA et VM, respectivement. En effet, l'analyse statistique montre que l'addition de 1% d'extrait d'artémisia retarde significativement ($P < 0.05$) la croissance des coliformes dans les filets de sardine au cours de la conservation sous vide comparé au témoin (cf. tableau n° 9). Les composés phénoliques sont connus de posséder à la fois des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes. L'efficacité d'un composé antimicrobien dépend des facteurs environnementaux tels que le pH, l'activité de l'eau, la température, la composition de l'atmosphère et la charge microbienne initiale du substrat alimentaire (Gould, 1989). L'effet des antioxydants phénoliques sur la croissance microbienne et la production des toxines pourrait être le résultat de la capacité des composés phénoliques de modifier la perméabilité des cellules microbiennes, ce qui permet la perte de macromolécules à partir de l'intérieur. Ils pourraient également interagir avec les protéines membranaires, provoquant une déformation de sa structure et de ses fonctionnalités (Fung et al., 1977). Cependant, le mécanisme d'action des composés phénoliques naturels n'a pas été

complètement élucidé. Naili et al. (2010) ont rapporté que les extraits méthanoliques des feuilles d'*Artemisia campestris* présentent des teneurs raisonnablement élevées en polyphénols et en alcaloïdes. L'ensemble de nos résultats montrent qu'il existe un retard de croissance des APC et des coliformes dans les groupes traités, où les charges dénombrées dans le groupe VA sont significativement plus faibles que le témoin ($P < 0.05$) après 6 jours de conservation (cf. tableau n° 9). En outre, une réduction significative des valeurs d'ABVT est observée dans la sardine traitée par l'extrait d'artémisia (VA) jusqu'à 17 jours de stockage réfrigéré (cf. tableau n° 7), résultant de teneurs élevées de l'extrait d'artémisia en polyphénols et en alcaloïdes, qui possèdent une excellente activité antimicrobienne. Nos constatations corroborent ceux obtenus par Kenar et al. (2010) pour les filets de sardine traités par les extraits de romarin et de sauge.

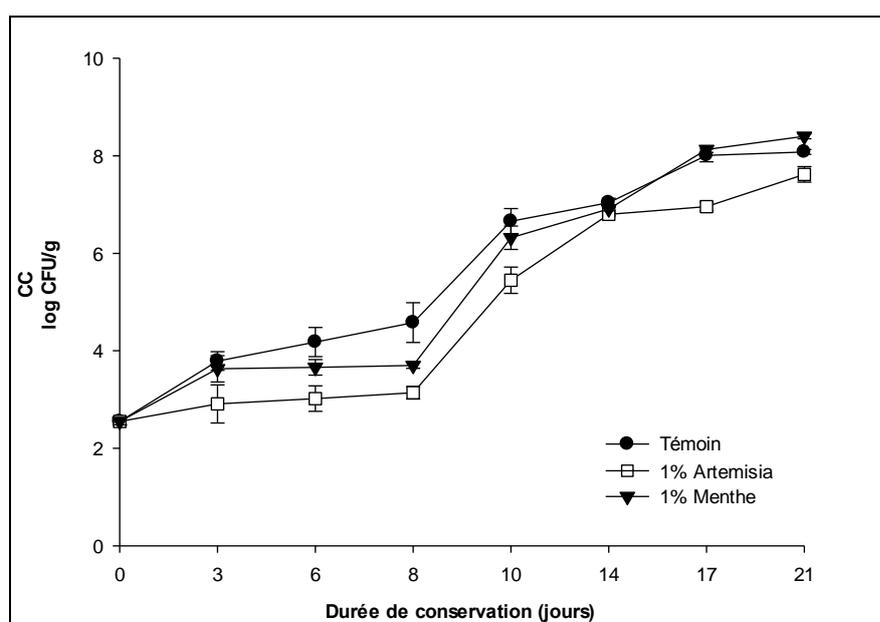


Figure n° 14 : Evolution des coliformes totaux (CC) au cours de l'entreposage des filets de sardine à 3±1 °C en emballage sous vide sans extrait (VC, groupe témoin), en emballage sous vide avec l'extrait d'artémisia 1% (VA) et en emballage sous vide avec l'extrait de menthe 1% (VM).

Les bactéries lactiques (LAB) forment le principal composant de la flore d'altération qui se développe dans l'emballage sous vide, les produits de poissons légèrement conservés et le poisson fumé à chaud après quelques semaines de stockage à basse température (Lyhs, 2009). La charge initiale de LAB est de 2.20 log UFC/g (jour 0) et augmente légèrement dans tous les groupes emballés sous vide à 3±1°C tout au long de la durée de conservation (cf.

figure n° 15). Comparée au témoin, l'utilisation d'extraits d'artémisia et de menthe en combinaison avec les conditions sous vide ne montre pas un effet significatif ($P > 0.05$) sur la croissance des populations de LAB dans les filets de sardine au cours de l'entreposage réfrigéré (cf. tableau n° 9). Les charges finales dénombrées de LAB ne dépassent pas le niveau de 4.69 log UFC/g dans tous les groupes aux différents temps de rejet organoleptique. Atrea et al. (2009) ont constaté que la population initiale de LAB dans le poulpe est de 3 log UFC/g, alors que seulement une charge de 6.9 log UFC/g est atteinte pour les échantillons de poulpe conservés en VP au 23^{ème} jour de conservation. De même, aucun effet significatif ($P > 0.05$) sur la réduction de la population de LAB n'a été observé après l'utilisation d'huile de thym avec les conditions de stockage en aérobiose ou en atmosphère modifiée (MAP) (Kykkidou et al., 2009). Cependant, les bactéries lactiques sont les plus résistantes parmi les bactéries Gram-positif à l'égard de l'action antimicrobienne des huiles essentielles. Elles inhibent également la croissance d'autres bactéries en raison de la formation d'acide lactique et de bactériocines, ce qui peut contribuer à leur croissance sélective au cours de l'altération des produits de la pêche (Stamatis et Arkoudelos, 2007).

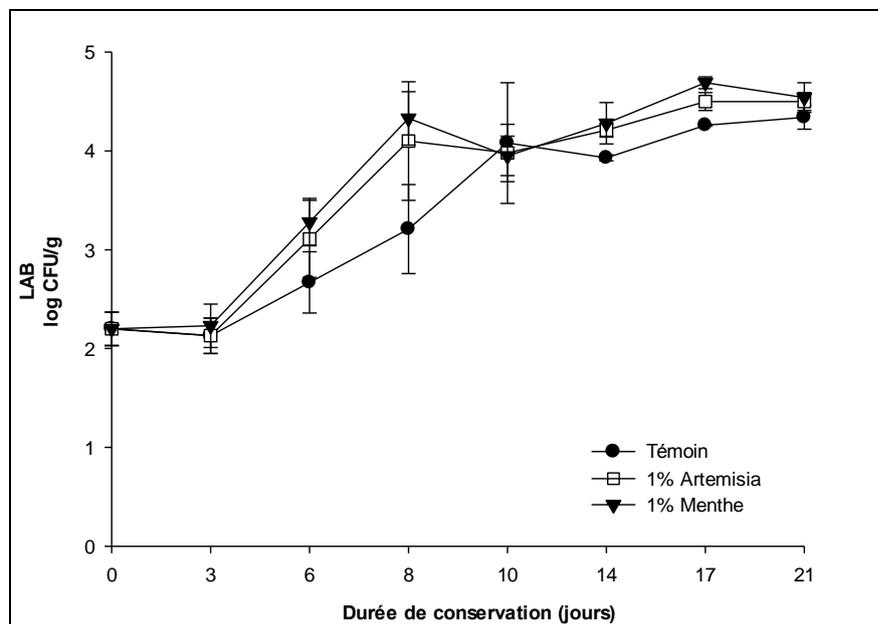


Figure n° 15 : Evolution des bactéries lactiques (LAB) au cours de l'entreposage des filets de sardine à 3±1 °C en emballage sous vide sans extrait (VC, groupe témoin), en emballage sous vide avec l'extrait d'artémisia 1% (VA) et en emballage sous vide avec l'extrait de menthe 1% (VM).

Tableau n° 9: Evolution des germes aérobies totaux (APC), des coliformes totaux (CC), des bactéries lactiques (LAB) et des bactéries formant histamine (HFB) dans les filets de sardine durant le stockage à 3 ± 1 °C en emballage sous vide sans extrait (VC, groupe témoin), en emballage sous vide avec l'extrait d'artémisia 1% (VA) et en emballage sous vide avec l'extrait de menthe 1% (VM).

Jours	APC	CC	LAB	HFB	Groupe
0	4.10±0.09 ^x	2.55±0.07	2.2±0.17	2.24±0.22	VC
3	4.96±0.11 ^a	3.79±0.19 ^a	2.13±0.18 ^a	3.25±0.15 ^a	VC
	4.85±0.15 ^a	2.91±0.39 ^b	2.13±0.18 ^a	2.61±0.14 ^b	VA
	4.94±0.10 ^a	3.63±0.27 ^a	2.23±0.22 ^a	2.86±0.26 ^b	VM
6	6.43±0.07 ^a	4.18±0.30 ^a	2.67±0.31 ^a	4.33±0.18 ^a	VC
	5.64±0.09 ^b	3.02±0.26 ^c	3.11±0.39 ^a	3.52±0.08 ^b	VA
	5.74±0.19 ^b	3.66±0.16 ^b	3.28±0.24 ^a	3.79±0.17 ^b	VM
8	7.90±0.04 ^a	4.58±0.41 ^a	3.21±0.45 ^b	5.41±0.21 ^a	VC
	6.43±0.04 ^b	3.14±0.13 ^c	4.10±0.60 ^{ab}	4.43±0.03 ^c	VA
	6.54±0.28 ^b	3.70±0.06 ^b	4.33±0.27 ^a	4.72±0.08 ^b	VM
10	7.93±0.03 ^a	6.66±0.26 ^a	4.08±0.61 ^a	6.64±0.12 ^a	VC
	7.42±0.16 ^c	5.45±0.27 ^b	3.98±0.29 ^a	5.72±0.20 ^b	VA
	7.74±0.02 ^b	6.32±0.24 ^a	3.95±0.20 ^a	6.39±0.06 ^a	VM
14	8.64±0.07 ^a	7.04±0.09 ^a	3.93±0.03 ^b	6.71±0.06 ^a	VC
	7.73±0.07 ^b	6.80±0.03 ^b	4.21±0.07 ^a	6.47±0.07 ^c	VA
	7.94±0.16 ^b	6.91±0.04 ^b	4.28±0.21 ^a	6.59±0.03 ^b	VM
17	8.69±0.04 ^a	8.01±0.13 ^a	4.26±0.01 ^c	7.23±0.42 ^a	VC
	7.88±0.06 ^b	6.96±0.09 ^b	4.50±0.09 ^b	6.64±0.19 ^b	VA
	8.73±0.07 ^a	8.13±0.06 ^a	4.69±0.06 ^a	7.23±0.15 ^a	VM
21	9.89±0.05 ^a	8.08±0.05 ^b	4.34±0.12 ^a	7.32±0.10 ^b	VC
	8.68±0.34 ^c	7.62±0.16 ^c	4.50±0.09 ^a	7.35±0.13 ^b	VA
	9.24 ±0.03 ^b	8.40±0.05 ^a	4.54±0.15 ^a	7.86±0.27 ^a	VM

^x Moyenne (log UFC/g) ± écart-type (n = 3).

Les différentes lettres minuscules (^{a-c}) dans une rangée indiquent des différences significatives (P < 0.05) entre les groupes.

Les bactéries décarboxylant l'histidine produisent l'histamine à partir de l'histidine libre dans le poisson altéré. Bien que certaines soient présentes dans la flore microbienne normale de poisson vivant, la plupart semblent provenir de la contamination post-capture dans les navires de pêche, des usines de traitement ou du système de commercialisation (Lehane et Olley, 2000). La figure n° 16 présente l'évolution des bactéries formant histamine (HFB) dans les échantillons de sardine stockés en emballage sous vide à 3 ± 1 °C. La charge initiale d'HFB est de 2.24 log UFC/g (jour 0) et augmente dans tous les groupes au cours de la période de conservation sous réfrigération. L'évolution de cette flore montre que les charges les plus faibles en HFB (P < 0.05) sont enregistrées dans les échantillons de sardine traités par

1% d'artémisia (VA) durant toute la période de conservation sous vide (cf. tableau n° 9), en raison de fortes teneurs en composés phénoliques et flavonoïdes provenant de l'extrait d'artémisia, qui possèdent une forte activité antimicrobienne. Akrouit et al. (2011) ont rapporté que les extraits hydro-éthanoliques et d'infusion d'*A. campestris* montrent des teneurs élevées en polyphénols et en flavonoïdes. De plus, les extraits méthanoliques des parties aériennes d'*A. campestris* et d'*A. vulgaris* sont des sources potentielles de substances actives telles que les antioxydants et les antimicrobiens naturels (Karabegovic et al., 2011).

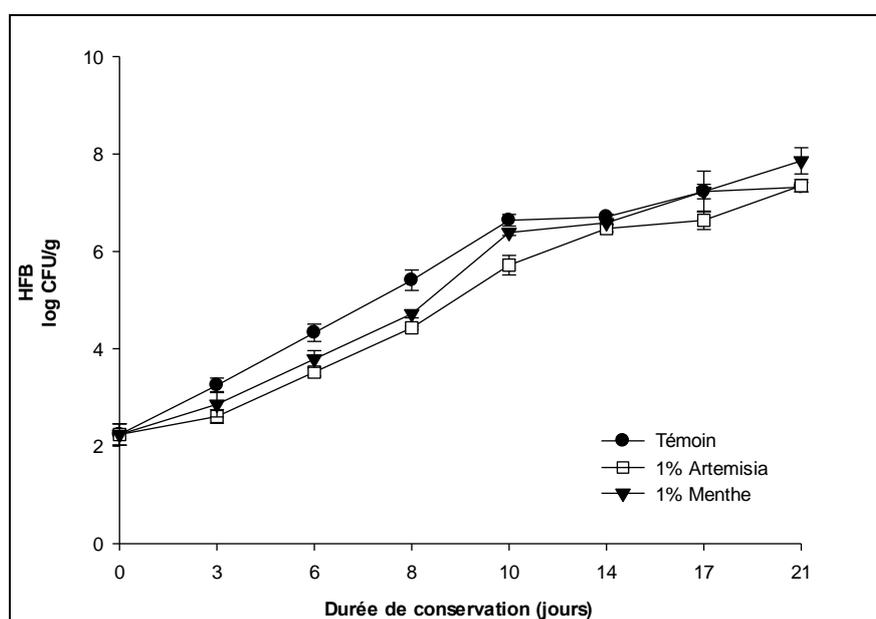


Figure n° 16 : Evolution des bactéries formant histamine (HFB) au cours de l'entreposage des filets de sardine à 3±1 °C en emballage sous vide sans extrait (VC, groupe témoin), en emballage sous vide avec l'extrait d'artémisia 1% (VA) et en emballage sous vide avec l'extrait de menthe 1% (VM).

Nos résultats montrent également que les taux d'histamine augmentent rapidement dans le muscle de sardine après 14 jours de conservation (cf. tableau n° 8), lorsque le nombre d'HFB dépasse le seuil de 6 log UFC/g dans tous les groupes entreposés sous vide à 3±1 °C. Sato et al. (1994) ont rapporté que la teneur en histamine des échantillons de maquereau stockés à 5 °C augmente rapidement lorsque le nombre de bactéries formant histamine est en dessus de 10⁶ cellules/g. Özogul et al. (2004) ont constaté que les faibles charges en HFB sont obtenues à partir de sardine stockée en MAP, suivie de VP et de conditions d'aérobiose. La formation de concentrations élevées d'histamine dans les produits de la pêche peut être assez rapide et dépend du nombre de micro-organismes présents dans ces produits (Ababouch et al.,

1991 ; Pacheco-Aguilar et al., 1998). Cependant, Omura et al. (1978) ont constaté que la présence d'un nombre élevé de bactéries productrices d'histamine ne corrèle pas nécessairement à des niveaux élevés d'histamine dans les échantillons de poisson. Dans la présente étude, de bonnes corrélations ont été trouvées entre le nombre de bactéries formant histamine et les faibles niveaux d'histamine dans les groupes traités pendant l'entreposage frigorifique ($r = 0.85$ pour le groupe VM, $r = 0.76$ pour le groupe VA, $P < 0.05$) par rapport au groupe VC ($r = 0.66$, $P > 0.05$). Ces résultats démontrent également l'efficacité du traitement par les extraits naturels sur la réduction de la croissance bactérienne et le maintien de la production d'histamine en dessous du seuil critique dans le muscle de poisson. Le mécanisme d'action des antimicrobiens naturels n'a pas été entièrement compris, mais Cowan (1999) a mentionné que la rupture de la membrane par les terpènes et les composés phénoliques, la chélation des métaux par les phénols et les flavonoïdes et l'effet sur le matériel génétique par la coumarine et les alcaloïdes peuvent inhiber la croissance des micro-organismes. L'efficacité du composé antimicrobien dépend du pH de l'aliment, du type et du nombre de micro-organismes contaminants, du type et de la concentration des antimicrobiens. La température de stockage peut également influencer sur l'efficacité des antimicrobiens comme la diffusibilité de ces composés (Friedman et al., 2004). En outre, Conner et Beuchat (1984) ont rapporté qu'une fois que les composés phénoliques traversent la membrane cellulaire, les interactions avec des enzymes membranaires et des protéines provoqueraient un écoulement inverse de protons, ce qui affecte l'activité cellulaire. Sur la base de ces résultats, il peut donc être conclu que la présence de composés phénoliques dans les extraits naturels et l'élimination de l'oxygène dans l'emballage peuvent affecter l'activité des enzymes de décarboxylation des acides aminés et modifier ainsi la perméabilité des cellules microbiennes, ce qui aboutit à une réduction de la formation des amines biogènes et une prévention de l'altération de poisson.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

L'étude finalisée, les résultats obtenus ont été donc proches de nos objectifs fixés au préalable, en effet la combinaison de l'emballage sous vide avec l'addition de 1% d'extrait d'*Artemisia campestris* ou de *Mentha spicata* fournit une longue durée de vie à la sardine (17 jours) par rapport au témoin (10 jours). L'évaluation organoleptique montre que les échantillons de sardine traités par les extraits de plantes sont fortement préférés par le panel d'évaluation sensorielle en raison de leur odeur et saveur agréables confirmés par les scores d'acceptabilité les plus élevés.

Par ailleurs, le suivi de l'oxydation des lipides, contrôlé par le SR-TBA, montre que la stabilité du produit à l'oxydation des lipides dépend non seulement des propriétés barrières à l'O₂ des sacs en polyéthylène utilisés dans l'emballage, mais aussi de l'activité antioxydante des acides phénoliques naturellement présents dans l'extrait de menthe, ce qui prévient l'altération du poisson et prolonge ainsi la durée de vie du produit.

Le traitement combiné d'extraits naturels avec l'emballage sous vide entraîne également une nette réduction de l'accumulation de l'histamine et de la tyramine dans la chair de poisson. En outre, l'extrait de menthe est le plus efficace pour réduire les niveaux de cadaverine, de spermidine et de sérotonine dans les filets de sardine, tandis que le traitement par l'extrait d'artémisia contribue à maintenir les charges bactériennes à de faibles niveaux pendant l'entreposage frigorifique.

Le contrôle bactériologique a permis également de mettre en évidence l'existence d'un retard de croissance bactérienne dans les groupes traités. Cette réduction corrobore avec une lente production d'ABVT et d'histamine jusqu'au temps de rejet organoleptique. Nos résultats suggèrent l'application d'une combinaison de deux ou plusieurs extraits de plantes comme des antimicrobiens naturels dans l'industrie du poisson, car chaque extrait de plante inactive une cible spécifique de production d'amines biogènes dans les bactéries formant amines.

Enfin, l'étude présente un grand intérêt pour l'industrie agroalimentaire car elle propose d'une part la création des pépinières pour les cultures des plantes aromatiques et d'autre part la mise en place des PME (petites et moyennes entreprises) spécialisées en extraction et purification des produits naturels pour des utilisations alimentaires. De plus, elle encourage l'industrie de poisson à mettre en place d'autres techniques de conservation telles que l'emballage sous vide (VP) et le conditionnement sous atmosphère modifiée (MAP) en combinaison avec l'utilisation des conservateurs naturels pour une commercialisation plus longue des différents types de poisson en particulier les petits pélagiques gras tels que la sardine, l'anchois, le saurel et l'allache, afin d'arriver à une meilleure maîtrise de l'exploitation de ce type d'aliment.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Ababouch, L. H., Souibri, L., Rhaliby, K., Ouahdi, O., Battal, M., and Busta, F. F. (1996). Quality changes in sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice and at ambient temperature. *Food Microbiology*, **13**, 123–132.
2. Ababouch, L., Afilal, M. E., Rhafiri, S., and Busta, F. F. (1991). Identification of histamine-producing bacteria isolated from sardine (*Sardina pilchardus*) stored in ice and ambient temperature (25 °C). *Food Microbiology*, **8**, 127–136.
3. Agati, G., Matteini, P., Goti, A., and Tattini, M. (2007). Chloroplast-located flavonoids can scavenge singlet oxygen. *New Phytologist*, **174**, 77–81.
4. Ahn, J., Grün, I. U., and Mustapha, A. (2007). Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. *Food Microbiology*, **24**, 7–14.
5. Akrouf, A., Gonzalez, L. A., El Jani, H., and Madrid P. C. (2011). Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia. *Food and Chemical Toxicology*, **49**, 342–347.
6. Aksnes, A. (1988). Location of enzymes responsible for autolysis in bulk-stored capelin (*Mallotus villosus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **44**, 263–271.
7. Aksnes, A., and Brekken, B. (1988). Tissue degradation, amino acid liberation and bacterial decomposition of bulk stored capelin, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **45**, 53–60.
8. Ali, M. S., Saleem, M., Ahmad, W., Parvez, M., and Yamdagni., R. (2002). A chlorinated monoterpene ketone, acylated b-sitosterol glycosides and a flavanone glycoside from *Mentha longigolia* (Lamiaceae). *Phytochemistry*, **59**, 889–895.
9. Anderson, D. W. J., and Fellers, C. R. (1952). The occurrence of trimethylamine and trimethylamine oxide in fresh water fishes. *Journal of Food Science*, **17**, 472–474.

10. Anthoni, U., Borresen, T., Christophersen, C., Gram, L., and Nielsen, P.H. (1990). Is trimethylamine oxide a reliable indicator for the marine origin of fishes?. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **97**, 569–571.
11. Antonacopoulos, N., and Vyncke, W. (1989). Determination of volatile basic nitrogen in fish: A third collaborative study by Western European Fish Technologists' Association (WEFTA). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung*, **189**, 309–316.
12. AOAC. (2003). Histamine in seafood: Fluorometric method (35.1.32 method 977.13) (17th ed.). *Association of official analytical chemists*, Washington, DC.
13. AOAC. (1990). Official Methods of Analysis of the Association of the Official Analysis Chemists (15th ed.). *Association of official analytical chemists*, Washington, DC.
14. AOAC. (1984). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (14th ed.). *Association of official analytical chemists*, Washington, DC.
15. AOCS. (1994). Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society. *American Oil Chemistry Society*, Champaign, IL.
16. Arnold, S.H., and Brown, W.D. (1978) Histamine toxicity from fish products. *Advances in Food Research*, **34**, 113–154.
17. Askar, A., and Treptow, H. (1986). *Biogene Amine in Lebensmitteln: Vorkommen, Bedeutung und Bestimmung*. Eugen Ulmer GmbH and Co, Stuttgart, Germany.
18. Atrea, I., Papavergou, A., Amvrosiadis, I., and Savvaidis, I.N. (2009). Combined effect of vacuum-packaging and oregano essential oil on the shelf-life of Mediterranean octopus (*Octopus vulgaris*) from the Aegean Sea stored at 4°C. *Food Microbiology*, **26**, 166–172.
19. Attouchi, M., and Sadok, S. (2011). The effects of essential oils addition on the quality of wild and farmed sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. *Food Bioprocess Technology*. DOI: 10.1007/s11947-011-0522-x.

20. Aubourg, S.P., Pineiro, C., and Gonzalez, M.J. (2004). Quality loss related to rancidity development during frozen storage of horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *Journal of American Oil Chemists' Society*, **81**, 671–678.
21. Auerswald, L., Morren, C., and Lopata, AL. (2006). Histamine levels in seventeen species of fresh and processed South African seafood, *Food Chemistry*, **98**, 231–239.
22. Awan, M.A., Fleet, I., and Thomas, C.L.P. (2008). Determination of biogenic diamines with a vaporization derivatisation approach using solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry, *Food Chemistry*, **111**, 462–468.
23. Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogues, T., and Vidal-Carou, M.C. (2002). Chemical and sensory changes in Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) under refrigeration (6–8 °C) and stored in ice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 6504–6510.
24. Bardócz, S. (1995). Polyamines in food and their consequences for food quality and human health, *Trends in Food Science and Technology*, **6**, 341–346.
25. Bardócz, S., Grant, G., Brown, D.S., Ralph, A., and Pusztai, A. (1993). Polyamines in food – implications for growth and health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **4**, 66–71.
26. Beltran, A., and Moral, A. (1990). Gas chromatographic estimation of oxidative deterioration in sardine during frozen storage. *Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie*, **23**, 499–504.
27. Beltrame, P., Beltrame, P.L., Carniti, P., Guardione, D., and Lanzetta, C. (1988). Inhibiting action of chlorophenols on biodegradation of phenol and its correlation with structural properties of inhibitors. *Biotechnology and Bioengineering*, **31**, 821–828.
28. Bensid, A., Ucar Y., Bendeddouche B., and Özogul, F. (2014). Effect of the icing with thyme, oregano and clove extracts on quality parameters of gutted and beheaded

- anchovy (*Engraulis encrasicolus*) during chilled storage. *Food Chemistry*, **145**, 681–686.
29. Bertelli, D., Plessi, M., and Miglietta, F. (2004). Effect of industrial microwave treatment on the antioxidant activity of herbs and spices. *Italian Journal of Food Science*, **16**, 97–103.
30. Beuchat, L.R. (2001). Control of foodborne pathogens and spoilage microorganisms by naturally occurring microorganisms. In: Wilson, C.L., and Droby, S. (eds.), *Microbial Food Contamination*. CRC Press, London, pp 149–169.
31. Bligh, E., and Dyer, W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**, 911–917.
32. Bonilla, A., Sveinsdottir, K., and Martinsdottir, E. (2007). Development of quality index method (QIM) scheme for fresh cod (*Gadus morhua*) fillets and application in shelf life study. *Food Control*, **18**, 352–358.
33. Borneman, W.S., Akin, D.E., and Vaneseltine, W.P. (1986). Effect of phenolic monomers on ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **52**, 1331–1339.
34. Boskou, D., Blekas, G., and Tsimidou, M. (2005). Phenolic compounds in olive and olives. *Current Topics in Nutraceutical Research*, **3**, 125–136.
35. Botta, J. R., Kennedy, K.M., Kiceniuk, J.W., and Legrow, J. (1992). Importance of redfeed level, fish size and roe content to the quality of roe capelin. *International Journal of Food Science and Technology*, **27**, 93–98.
36. Bover-Cid, S., and Holzapfel, W.H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, **53**, 33–41.

37. Brewer, M.S. (2011). Review: Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **10**, 221–247.
38. Brownmiller, C., Howard, L.R., and Prior, R.L. (2008). Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products. *Journal of Food Science*, **73**, H72–H79.
39. Burt, S., (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, **94**, 223–253.
40. Burt, J. R., and Hardy, R. (1992). Composition and deterioration of pelagic fish. In: Burt, J. R., Hardy, R., and Whittle, K. J. (eds.), *Pelagic fish: the resource and its exploitation*. The University Press, Cambridge, pp 115–141.
41. Carelli, D., Centonze, D., Palermo, C., Quinto, M., and Rotunno, T. (2007). An interference free amperometric biosensor for the detection of biogenic amines in food products. *Biosensors and Bioelectronics*, **23**, 640–647.
42. Chan, H.W-S. (1987). *Autoxidation of Unsatuated Lipids*, Academic Press.
43. Chen, H. Y., Lin, Y. C., and Hsieh, C. L. (2007). Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. *Food Chemistry*, **104**, 1418–1424.
44. Chen, Q., Shi, H., and Ho, C.T. (1992). Effects of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **69**, 999–1002.
45. Cho, S., Endo, Y., Fujimoto, K., and Kaneda, T. (1989). Oxidative deterioration of lipids in salted and dried sardines during storage at 5°C. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**, 541–544.
46. Connell, J. J. (1975). *Control of fish quality*. Fishing News Books, Ltd., Surrey, UK.

47. Conner, D. E., and Beuchat, L. R. (1984). Sensitivity of heat-stressed yeasts to essential oils of plants. *Applied and Environmental Microbiology*, **47**, 229–233.
48. Corraze, G., and Kaushik, S. (1999). Les lipides des poissons marins et d'eau douce. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, **6**, 111–115.
49. Cowan, M. M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **12**, 564–582.
50. Dalgaard, P., Emborg, J., Kjolby, A., Sorensen, N. D., and Ballin, N. Z. (2008). Histamine and biogenic amines: formation and importance in seafood. In: Borresen, T., (ed), *Improving Seafood Products for the Consumer*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp 292–316.
51. Dalgaard, P., Mejlholm, O., Christiansen, T. J., and Huss, H. H. (1997). Importance of *Photobacterium phosphoreum* in relation to spoilage of modified atmosphere packed fish products. *Letters in Applied Microbiology*, **24**, 373–378.
52. Dalgaard, P. (1993). *Evaluation and prediction of microbial fish spoilage*. Ph.D. Thesis. The Technological Laboratory of the Danish Ministry of Fisheries and the Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark.
53. Dall'Acqua, S., Cervellati, S., Speroni, E., Costa, S., Guerra, M.C, Stella, L., Greco, E., and Innocenti, G. (2009). Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of *Laurus nobilis* L. Leaf Infusion. *Journal of Medicinal Food*, **12**, 869–876. DOI: 10.1089/jmf.2008.0119.
54. Davidson, P.M. (2001). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., and Montville, T.J. (eds.), *Food Microbiology: Fundamental and Frontiers*. 2nd ed. ASM Press, Washington DC, pp 593–627.
55. Devaraju, A.N., and Setty, T.M.R. (1985). Comparative study of fish bacteria from tropical and cold/temperate marine waters. Spoilage of tropical fish and product development. *FAO Fisheries Report*.

56. Djeridane, A., Yousfi, M., Brunel, J. M., and Stocker, P. (2010). Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 2599–2606.
57. Dorman, H. J. D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., and Tikkanen, M. J. (2003a). Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected *Lamiaceae* herbs. *Food Chemistry*, **83**, 255–62.
58. Dorman, H. J. D., Kosar, M., Kahlos, K., Holm, Y., and Hiltunen, R. (2003b). Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 4563–4569.
59. Draisci, R., Volpe, G., Lucentini, L., Cecilia, A., Federico, R., and Palleschi, G. (1998). Determination of biogenic amines with an electrochemical biosensor and its application to salted anchovies. *Food Chemistry*, **62**, 225–232.
60. Du, W.X., Lin, C. M., Phu, A. T., Cornell, J. A., Marshall, M. R., and Wei, C. I. (2002). Development of biogenic amines in yellowfin tuna (*Thunnus albacore*): Effect of storage and correlation with decarboxylase-positive bacterial flora. *Journal of Food Science*, **67**, 292–301.
61. EEC (European Economic Community). (2005). Commission regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, **L338**, 1–25.
62. EEC (European Economic Community). (2004). Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. *Official Journal of the European Union*, **L 226**, 22–82.
63. EEC (European Economic Community). (1996). Council Directive EEC 91/493/EEC of 22 July 1991 laying down the health conditions for the production and the placing

- on the market of fishery products. *Official Journal of the European Union*, **L 268**, 0015–0034.
64. EEC (European Economic Community) 1995. Decision 95/149/EC: total volatile basic nitrogen (TVBN) limit values for certain categories of fishery products and specifying the analysis methods to be used. *Official Journal of the European Union*, **L 097**:84–87.
65. Elgayyar, M., and Draughton, F.A. (1999). Use of extracts of *Nigella sativa* to inhibit spoilage and pathogenic microorganisms in rainbow trout. Annual Meeting of International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians, Detroit, Aug, 1–4.
66. El-Marrakchi, A. E., Bennour, M., Bouchaiti, N., Hama, A., and Tagafait, H. (1990). Sensory, chemical and microbiological assessment of Moroccan sardines (*Sardinas pilchardus*) stored in ice. *Journal of Food Protection*, **53**, 600–605.
67. Emborg, J., Dalgaard, P., and Ahrens, P. (2006). *Morganella psychrotolerans* sp. nov., a histamine producing bacterium isolated from various seafoods. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**, 2473–2479.
68. Emborg, J., Laursen, B.G., and Dalgaard, P. (2005). Significant histamine formation in tuna (*Thunnus albacares*) at 2 °C—effect of vacuum- and modified atmosphere-packaging on psychrotolerant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, **101**, 263–279.
69. Emborg, J. Laursen, B.G., Rathjen, T., and Dalgaard, P. (2002). Microbial spoilage and formation of biogenic amines in fresh and thawed modified atmosphere packed salmon (*Salmo salar*) at 2 °C. *Journal of Applied Microbiology*, **92**, 790–799.
70. Erkan, N., Tosun, S. Y., Ulusoy, S., and Uretener, G. (2010). The use of thyme and laurel essential oil treatments to extend the shelf life of bluefish (*Pomatomus saltatrix*) during storage in ice. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*. DOI: 10.1007/s00003-010-0587-x.

71. Fardiaz, D., and Markakis, P. (1979). Amine in fermented fish paste. *Journal of Food Science*, **44**, 1562–1563.
72. Farag, R.S., Daw, Z.Y., Hewedi, P.M., and El-Baroty, G.S.A. (1989). Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *Journal of Food Protection*, **52**, 665–667.
73. FDA (Food Drug Administration). (2001). Scombrototoxin (histamine) formation. In: Food and Drug Administration (ed.), *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance*. Center for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Seafood, Washington DC, pp 83–102.
74. Fernandez-Salguero, J., and Mackie, I.M. (1987). Technical note: Preliminary survey of the content of histamine and other higher amines in some samples of Spanish canned fish. *International Journal of Food Science and Technology*, **22**, 409–412.
75. Fernandez-Salguero, J. and Mackei, I.M. (1987). Comparative rates of spoilage of fillets and whole fish during storage of haddock (*Melanogammus aeglefinus*) and herring (*Clupea arengus*) as determined by the formation of non-volatile and volatile amines. *International Journal of Food Science and Technology*, **22**, 385–390.
76. Fernandez, M. T., Mira, M. L., Florencio, M. H., and Jennings, K. R. (2002). Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **92**, 105–111.
77. Fitzgerald, D.J., Stratford, M., Gasson, M.J., Ueckert, J., Bos, A., and Narbad, A. (2004). Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *Journal of Applied Microbiology*, **97**, 104–113.
78. Flick, G. R., and Martin, R. E. (1992). *Advances in seafood biochemistry, composition and quality*. Lancaster: Technomic Publishing Co.
79. Frank, H. A., Baranowski, J. D., Chongsiriwatana, M., Brust, P. A., and Premaratne., R. J. (1985). Identification and decarboxylase activities of bacteria isolated from

- decomposed mah-mahi (*Coriphaena hippurus*) after incubation at 0 and 32 °C. *International Journal of Food Microbiology*, **2**, 331–340.
80. Frank, H.A., Yoshinaga, D.H., and Nip, W.K. (1981). Histamine formation and honeycombing during decomposition of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*, at elevated temperatures. *Marine Fisheries Review*, **43**, 9–14.
81. Frankel, E.N. (1991). Recent advances in lipid oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 495–511.
82. Frankel, E. N., Huang, S.W., Aeschbach, R., and Prior, E. (1996). Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosinic acid, carnosol and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 131–135.
83. Friedman, M., Henika, P. R., Levin, C. E., and Mandrell, R.E. (2004). Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 6042–6048.
84. Fuchs, R. S., and Reilly, P. J. A. (1992). The incidence and significance of *Listeria monocytogenes* in seafoods. In: Huss, H.H., Jakobsen, M., and Liston, J. (eds.), *Quality Assurance in the Fish Industry*. Elsevier Science Publishers, pp 217–230.
85. Fujii, T., Satomi, M., Nakatsuka, G., Yamaguchi, T., and Okuzumi, M. (1994). Changes in freshness indexes and bacterial flora during storage of pressurized mackerel. *Food Hygiene and Safety Science*, **35**, 195–200.
86. Fukuda, Y., and Namiki, M. (1988). Recent studies on sesame seed and oil. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **35**: 552–562.
87. Fukuda, Y., Nagata, M., Osawa, T., and Namiki, M. (1986). Chemical aspects of the antioxidative activity of roasted sesame seed oil, and the effect of using the oil for frying. *Agricultural and Biological Chemistry*, **50**, 857–862.

88. Fung, D. Y. C., Taylor, S., and Kahan, J. (1977). Effects of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Safety*, **1**, 39–51.
89. Geissman, T.A. (1963). Flavonoid compounds, tannins, lignins and related compounds. In: Florkin, M., and Stotz, E.H. (eds.), *Pyrrole Pigments, Isoprenoid Compounds and Phenolic Plant Constituents*. Elsevier, New York, pp 265.
90. Geldof, N., and Engeseth, N. J. (2002). Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 3050–3055.
91. German, J.B., Chen, S.E. and Kinsella, J.E. (1985). Lipid oxidation in fish tissue. Enzymic initiation via lipoxygenase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **33**, 680–683.
92. Gessner, B., Hokama, Y., and Isto, S. (1996). Scombrototoxicosis-like illness following the ingestion of smoked salmon that demonstrated low histamine levels and high toxicity on mouse bioassay. *Clinical Infectious Diseases*, **23**, 1316–1318.
93. Gildberg, A. (1978). Proteolytic activity and the frequency of burst bellies in capelin. *Journal of Food Technology*, **13**, 409–416.
94. Gill, A.O., and Holley, R.A. (2006). Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, **108**, 1–9.
95. Gokoglu, N., Yerlikaya, P., and Cengiz, E. (2004). Changes in biogenic amine contents and sensory quality of sardine (*Sardina pilchardus*) stored at 4 and 20 °C. *Journal of Food Quality*, **27**, 221–231.
96. Gosetti, F., Mazzucco, E., Gianotti, V., Polati, S., and Gennaro, M. C. (2007). High performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of

- biogenic amines in typical Piedmont cheeses. *Journal of Chromatography A*, **1149**, 151–157.
97. Goulas, A. E., and Kontominas, M. G. (2007). Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*, **100**, 287–296.
98. Gould, G.W., 1989. Introduction. In: Gould, G.W. (ed.), *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures*. Elsevier Applied Science, London, pp 1–42.
99. Gram, L., Trolle, G., and Huss, H. H. (1987). Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0 °C) and high (20 °C) temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, **4**, 65–72.
100. Gram, L. (1990). Spoilage of three Senegalese fish species stored in ice and at ambient temperature. Paper presented at SEAFOOD 2000, Halifax, Canada.
101. Gram, L., Wedell-Neergaard, C., and Huss, H. H. (1990). The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (*Lates niloticus*). *International Journal of Food Microbiology*, **10**, 303–316.
102. Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A., and Ozkan, H., (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *Longifolia*. *Food Chemistry*, **103**, 1449–1456.
103. Gutierrez, C., Rubio, S., Gomez-Hens, A., and Valcarcel, M. (1987). Determination of histamine by derivative synchronous fluorescence spectrometry. *Analytical Chemistry*, **59**, 769–773.
104. Haaland, H., Arnesen, E., and Njaa, L.R. (1990). Amino-acid-composition of whole mackerel (*Scomber scombrus*) stored anaerobically at 20 °C and at 2 °C. *International Journal of Food Science and Technology*, **25**, 82–87.

105. Haaland, H., and Njaa, L.R. (1988). Ammonia (NH₃) and total volatile nitrogen (TVN) in preserved and unpreserved stored, whole fish. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **44**, 335–342.
106. Hager, T. J., Howard, L. R., Liyanage, R., Lay, J. O., and Prior, R. L., (2008). Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 661–669.
107. Halász, A., Barath, A., Simon-Sarkadi, L., and Holzapfel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology*, **5**, 42–49.
108. Hamre, K., Lie, Ø., and Sandnes, K. (2003). Development of lipid oxidation and flesh colour in frozen stored fillets of Norwegian spring-spawning herring (*Clupea harengus* L.). Effects of treatment with ascorbic acid. *Food Chemistry*, **82**, 447–453.
109. Hashimoto, T., Kumazawa, S., Nanjo, F., Hara, Y., and Nakayama, T. (1999). Interaction of tea catechins with lipid bilayers investigated with liposome systems. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **63**, 2252–2255.
110. Hayes, S. A., Unklesbay, N., and Grun, I.U. (2004). Isoflavone stability in chocolate beverages. *ACS Symposium Series*, **871**, 189–199.
111. Hebard, C. E., Flick, G. J., and Martin, R. E. (1982). Occurrence and significance of trimethylamine oxide and its derivatives in fish and shellfish. In: Martin, R. E., Flick, G. J. and Hebard, C. E. (eds.), *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products*. AVI, Westport, CT, USA, pp 149–304.
112. Heipieper, H. J., Keweloh, H., and Rehm, H. J. (1991). Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**, 1213–1217.
113. Herbert, R. A., and Shewan, J. M. (1975). Precursors of the volatile sulphides in spoiling North Sea cod (*Gadus morhua*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **26**, 1195–1202.

114. Hjelmeland, K., Christie, M., and Raa, J. (1983). Skin mucus protease from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and its biological significance. *Journal of Fish Biology*, **23**, 13–22.
115. Hungerford, M., Hollingworth, T. A., and Wekell, M. M. (2001). Automated kinetics-enhanced flow-injection method for histamine in regulatory laboratories: Rapid screening and suitability requirements. *Analytica Chimica Acta*, **438**, 123–129.
116. Huss, H. H. (1999). *Qualité et son évolution dans le poisson frais*. FAO document technique sur les pêches, n° 348, Rome, FAO.
117. Huss, H. H. (1995). *Assurance de qualité des produits de la mer*. FAO Document technique sur les pêches, n° 334, Rome, FAO.
118. ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). (1986). *Microorganisms in foods. Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications*, vol. 2. University of Toronto Press, Toronto.
119. Jacobsen, C., Undeland, I., Storro, I., Rustad, T., Hedges, N., and Medina, I. (2008). Preventing lipid oxidation in seafood. In: Borresen, T. (ed.), *Improving seafood products for the consumer*. Woodhead Publishing, Ltd., Cambridge, pp 426–453.
120. Jorgensen, L. V., Huss, H. H., and Dalgaard, P. (2000a). The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis in cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology*, **89**, 920–934.
121. Jorgensen, L. V., Dalgaard, P., and Huss, H. H. (2000b). Multiple compound quality index for cold-smoked salmon (*Salmo salar*) developed by multivariate regression of biogenic amines and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 2448–2453.
122. Kanatt, S.R., Chander, R., and Sharma, A. (2010). Antioxidant and antimicrobial activity of pomegranate peel extract improves the shelf life of chicken products. *International Journal of Food Science and Technology*, **45**, 216–222.

123. Kanatt, S. R., Chander, R., and Sharma, A. (2007). Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chemistry*, **100**, 451–458.
124. Kanki, M., Yoda, T., Ishibashi, M., and Tsukamoto, T. (2004). *Photobacterium phosphoreum* caused a histamine fish poisoning incident. *International Journal of Food Microbiology*, **92**, 79–87.
125. Karabegovic, I., Nikolova, M., Velickovic, D., Stojicevic, S., Veljkovic, V., and Lazic, M. (2011). Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of methanolic extracts of the *Artemisia* sp. recovered by different extraction techniques. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, **19**, 504–511.
126. Kenar, M., Özogul, F. and Kuley, E. (2010). Effects of rosemary and sage tea extracts on the sensory, chemical and microbiological changes of vacuum-packed and refrigerated sardine (*Sardina pilchardus*) fillets. *International Journal of Food Science and Technology*, **45**, 2366–2372.
127. Keweloh, H., Weyrauch, G., and Rehm, H. N. (1990). Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **33**, 66–71.
128. Khanduja K. L. (2003). Stable free radical scavenging and antiperoxidative properties of resveratrol in vitro compared with some other bioflavonoids. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, **40**, 416–22.
129. Kim, J., Marshall, M. R., and Wei, C. (1995). Antimicrobial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**, 2839–2845.
130. Kim, K., and Cho, H. Y. (2001). Antioxidant effects of *Origanum majorana* L. on superoxide anion radicals. *Food Chemistry*, **75**, 439–44.
131. Kim, S. H., Wei, C. I., Clemens, R. A., and Haejung, A. (2004). Review: Histamine accumulation in seafoods and its control to prevent outbreaks of scombroid poisoning. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **13**, 81–100.
-

132. Kim, S. H., Field, K. G., Chang, D. S., Wei, C. I., and An, H. J. (2001). Identification of bacteria crucial to histamine accumulation in Pacific mackerel during storage. *Journal of Food Protection*, **64**, 1556–1564.
133. Klausen, N. K., and Huss, H. H. (1987). Rapid method for detection of histamine-producing bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, **5**, 137–146.
134. Kostaki, M., Giatrakou, V., Savvaidis, I. N., and Kontominas, M. G. (2009). Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *Food Microbiology*, **26**, 475–482.
135. Krizek, M., Vacha, F., Vorlova, L., Lukasova, J. and Cupakova, S. (2004). Biogenic amines in vacuum-packed and non-vacuum-packed flesh of carp (*Cyprinus carpio*) stored at different temperatures. *Food Chemistry*, **88**, 185–191.
136. Kuley, E., Özogul, F., Durmus, M., Gokdogan, S., Kacar, C., Özogul, Y., and Ucar, Y. (2012). The impact of applying natural clinoptilolite (zeolite) on the chemical, sensory and microbiological changes of vacuum-packed sardine fillets. *International Journal of Food Science and Technology*, **47**, 1977–1985.
137. Kvasnicka, F., and Voldrich, M. (2006). Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection. *Journal of Chromatography A*, **1103**, 145–149.
138. Kykkidou, S., Giatrakou, V., Papavergou, A., Kontominas, M. G., and Savvaidis, I. N. (2009). Effect of thyme essential oil and packaging treatments on fresh Mediterranean swordfish fillets during storage at 4 °C. *Food Chemistry*, **115**, 169–175.
139. Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., and Nychas, G. J. E. (2001). A study of minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, **91**, 453–462.

140. Lapa-Guimaraes, J., and Pickova, J. (2004). New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid. *Journal of Chromatography A*, **1045**, 223–232.
141. Lee, H., Kim, S. H., Sang, C. I., Jun, H., Eun, J. B., and An, H. (2005). Histamine and other biogenic amines and bacterial isolation in retail canned anchovies. *Journal of Food Science*, **70**, C145–C150.
142. Lee, K. G., and Shibamoto, T. (2002). Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 4947–4952.
143. Lehane, L., and Olley, J. (2000). Review: Histamine fish poisoning revisited. *International Journal of Food Microbiology*, **58**, 1–37.
144. Lerke, P.A., Martina, P.N., and Henry, B.C. (1983). Screening test for histamine in fish. *Journal of Food Science*, **48**, 155–157.
145. Lin, Y. T., Labbe, R. G., and Shetty, K. (2004). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in fish and meat systems by use of oregano and cranberry phytochemical synergies. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 5672–5678.
146. Liston, J. (1980). Microbiology in fishery science. In: Connell, J. J. (ed.), *Advances in fishery science and technology*. Fishing News Books Ltd., Farnham, England, pp 138–157.
147. Leonart, J. (2005). Mediterranean and Black Sea. FAO Statistical Area 37. In: Food and Agriculture Organization of the United Nations (ed.), *Review of the state of world marine fishery resources*. FAO Fisheries Technical Paper, 457, Rome, pp 49–64.
148. Lopez-Galvez, D., De la Hoz, L., and Ordonez, J. A. (1995). Effect of carbon dioxide and oxygen enriched atmospheres on microbiological and chemical changes in refrigerated tuna (*Thunnus alalunga*) steaks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**, 483–490.

149. Love, R. M. (1970). *The Chemical Biology of Fishes*. London: Academic Press, Inc.
150. Lyhs, U. (2009). Microbiological methods. In: Rehbein, H., and Oehlenschläger, J. (eds.), *Fishery products, quality, safety and authenticity*. Blackwell Publishing, Ltd., UK, pp 318–348.
151. Mackie, I. M., Pirie, L., Ritchie, A. H., and Yamanaka, H. (1997). The formation of non-volatile amines in relation to concentration of free basic amino acid during postmortem storage of the muscle of scallop (*Pecten maximus*), herring (*Clupea harengus*) and mackerel (*Scomber scombrus*). *Food Chemistry*, **60**, 291–295.
152. Madsen, H. L., Nielsen, B. R., Bertelsen, G., and Skibsted, L. H. (1996). Screening of antioxidative activity of spices. A comparison between assays based on ESR spin trapping and electrochemical measurement of oxygen consumption. *Food Chemistry*, **57**, 331–7.
153. Mahmoud, B., Yamazaki, K., Miyashita, K., Ii-Shik, S., Dong-Suk, C., and Suzuki, T. (2004). Bacterial microflora of carp (*Cyprinus carpio*) and its shelf-life extension by essential oils compounds. *Food Microbiology*, **21**, 657–666.
154. Maijala, R. L., Eerola, S. H., Aho, M. A., and Hirn, J. A. (1993). The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat. *Journal of Food Protection*, **50**, 125–129.
155. Manzocco, L., Anese, M., and Nicoli, M. C. (1998). Antioxidant properties of tea extracts as affected by processing. *LWT—Food Science and Technology*, **31**, 694–698.
156. Marc, F., Davin, A., Delgène-Brenbrahim, L., Ferrand, C, Baccaunaud, M., and Fritsch, P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel d'antioxydant dans les aliments. *Médecine/sciences*, **20**, 458–463.
157. Medina, I., Gallardo, J. M., Gonzlez, M. J., Lois, S., and Hedges, N. (2007). Effect of molecular structure of phenolic families as hydroxycinnamic acids and catechins on their antioxidant effectiveness in minced fish muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 3889–3895.

158. Mejlholm, O., and Dalgaard, P. (2002). Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage microorganism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*, **34**, 27–31.
159. Melton, S. (1983). Methodology for following lipid oxidation in muscle foods. *Food Technology*, **37**, 111–116.
160. Mendel, B., Kemp, A., and Myers, D. K. (1954). A colorimetric micro-method for the determination of glucose. *Biochemical Journal*, **56**, 639–646.
161. Mendes, R. (2009). Biogenic amines. In: Rehbein, H., Oehlenschläger, J. (eds.), *Fishery Products: Quality, Safety and Authenticity*. Blackwell Publishing Ltd., UK, pp 42–59.
162. Mendes, R., Pestana, C., and Gonçalves, A. (2008). The Effects of soluble gas stabilisation on the quality of packed sardine fillets (*Sardina pilchardus*) stored in air, VP and MAP. *International Journal of Food Science and Technology*, **43**, 2000–2009.
163. Mendes, R., Silva, H. A., Nunes, M. L., and Abecassis Empis, J. M. (2005). Effect of low-dose irradiation and refrigeration on the microflora, sensory characteristics and biogenic amines of Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *European Food Research Technology*, **221**, 329–335.
164. Mendes, R., Gonçalves, A., and Nunes, M. L. (1999). Changes in free amino acids and biogenic amines during ripening of fresh and frozen sardine. *Journal of Food Biochemistry*, **23**, 295–306.
165. Mendes, R. (1999). Changes in biogenic amines of major Portuguese bluefish species during storage at different temperatures. *Journal of Food Biochemistry*, **23**, 33–43.
166. Mietz, J. L., and Karmas, E. (1978). Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster and shrimp as an indicator of decomposition. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **61**, 139–145.

167. Miyazawa, T., Yamaguchi, M., Lee, J., Fujimoto, K., and Kaneda, T. (1984). Decomposition of lipid hydroperoxide by choline and ethanolamine. *Agricultural and Biological Chemistry*, **48**, 1375–1377.
168. Middlebrooks, B.L., Toom, P. M., Douglas, W. L., Harrison, R. E., and Mcdowell, S. 1988. Effects of storage time and temperature on the microflora and amine development in Spanish mackerel (*Scomberomorus maculatus*). *Journal of Food Science*, **53**, 1024–1029.
169. Mohan, C. O., Ravishankar, C. N., Gopal, T. K. S., Kumar, K. A., and Lalitha, K. V. (2009). Biogenic amines formation in seer fish (*Scomberomorus commerson*) steaks packed with O₂ scavenger during chilled storage. *Food Research International*, **42**, 411–416.
170. Molins, R. A. (2001). Irradiation of meats and poultry. In: Molins, R. A. (ed.), *Food Irradiation: Principles and Application*. John Wiley and Sons Inc., New York, pp 131–191.
171. Moret, S., and Conte, L.S. (1996). High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods—An analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. *Journal of Chromatography A*, **729**, 363–369.
172. Morita, R.Y. (1975). Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Reviews*, **39**, 144–167.
173. Morzel, M., and Van de Vis, H. (2003). Effect of the slaughter method on the quality of raw and smoked eels (*Anguilla Anguilla* L.). *Aquaculture Research*, **34**, 1–11.
174. MPRH (Ministère de la pêche et des ressources halieutiques). (2003). Schéma national de développement des activités de la pêche et de l'aquaculture. Algérie, MPRH, pp 77.
175. Muchuweti, M., Kativu, E., Mupure, C. H., Chidewe, C., Ndhlala, A. R., and Benhura, M. A. N. (2007). Phenolic composition and antioxidant properties of some spices. *American Journal of Food Technology*, **2**, 414–420.

176. Munné-Bosch, S. (2005). The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology*, **162**, 743–748.
177. Murray, C. K., and Fletcher, T.C. (1976). The immunohistochemical localization of lysozyme in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) tissues. *Journal of Fish Biology*, **9**, 329–334.
178. Naczk, M., and F. Shahidi. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **4**, 1523–1542.
179. Naila, A., Flint, S., Fletcher, G., Bremer, P., and Meerdink, G. (2010). Control of biogenic amines in food—existing and emerging approaches. *Journal of Food Science*, **75**, R139–R150.
180. Naili, M. B., Alghazeer, R. O., Saleh, N. A., and Al-Najjar, A. Y. (2010). Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). *Arabian Journal of Chemistry*, **3**, 79–84.
181. Nakatani, N. (2003). Biologically functional constituents of spices and herbs. *Journal of Japan Society of Nutrition and Food Sciences*, **56**, 389–395.
182. Nawar, W. F. (1996). Lipids. In: Fennema, O. (ed.), *Food chemistry*. 3rd ed. Marcel Dekker, Inc., New York, pp 225–320.
183. Negi, P.S. (2012). Review: Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, **156**, 7–17.
184. Nguyen, P., and Mittal, G. S. (2007). Inactivation of naturally occurring microorganisms in tomato juice using pulsed electric field (PEF) with and without antimicrobials. *Chemical Engineering and Processing*, **46**, 360–365.
185. Nicoli, M. C., Anese, M., and Parpinel, M. (1999). Influence of processing on the antioxidant properties of fruits and vegetables. *Trends in Food Science and Technology*, **10**, 94–100.

186. Norme NF-V 08-51. (1999). Technique de dénombrement de la flore aérobie mésophile totale par comptage des colonies obtenues à 30°C. Association Française de Normalisation (AFNOR), Paris.
187. Norme NF-V 08-050. (2009). Dénombrement des coliformes présumés par comptage des colonies à 30°C. Association Française de Normalisation (AFNOR), Paris.
188. Norme NF-V 04-503. (1988). Viandes et produits à base de viande – Dénombrement des bactéries lactiques. Association Française de Normalisation (AFNOR), Paris.
189. Nunes, M. L., Batista, I., and Morao de Campos, R. (1992). Physical, chemical and sensory analysis of Sardine (*Sardine pilchardus*) stored in ice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **59**, 37–43.
190. Nychas, G. J. E., Skandamis, P. N., and Tassou, C. C. (2003). Antimicrobials from herbs and spices. In: Roller, S. (ed.), *Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods*. CRC Press, Washington DC, pp 177–199.
191. Ochiai, Y., Aleman-Polo, J. M., and Hashimoto, K. (1990). Postmortem diffusion of taurine and free histidine between ordinary and dark muscle of mackerel during ice storage. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 1017.
192. Okuzumi, M., Hiraishi, A., Kobayashi, T., and Fujii, T. (1994). *Photobacterium histaminum* sp. nov., a histamine-producing marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **44**, 631–636.
193. Olafsdottir, G. E., Martinsdottir, J., Oehlenschlager, P., Dalgaard, B., and Jensen, I. U. (1997). Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science and Technology*, **8**, 258–265.
194. Omura, Y., Price R. J., Olcott, H. S. (1978). Histamine-forming bacteria isolated from spoiled skipjack tuna and jack mackerel. *Journal of Food Science*, **43**, 1779–1781.
195. Önal, A. (2007). A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, **103**, 1475–1486.

196. Onibi, G. E., Scaife, J. R., Murray, I., and Fowler, V. R. (2000). Supplementary α -tocopherol acetate in full-fat rapeseed-based diets for pigs: effect on performance, plasma enzymes and meat drip loss. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **80**, 1617–1624.
197. Oussalah, M., Caillet, S., Lacroix, M., 2006. Mechanism of action Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membrane and walls of *E. coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, **69**, 1046–1055.
198. Özogul, F., Kuley, E., and Kenar, M. (2011). Effects of rosemary and sage tea extract on biogenic amines formation of sardine (*Sardina pilchardus*) fillets. *International Journal of Food Science and Technology*, **46**, 761–766.
199. Özogul, F., Özogul, Y., and Kuley, E. (2008). Nucleotide degradation and biogenic amine formation of wild white grouper (*Epinephelus aeneus*) stored in ice and at chill temperature (4 °C). *Food Chemistry*, **108**, 933–941.
200. Özogul, F., and Özogul, Y. (2006). Biogenic amine content and biogenic amine quality indices of sardines (*Sardina pilchardus*) stored in modified atmosphere packaging and vacuum packaging. *Food Chemistry*, **99**, 574–578.
201. Özogul, Y., Özyurt, G., Özogul, F., Kuley, E., and Polat, A. (2005). Freshness assessment of European eel (*Anguilla anguilla*) by sensory, chemical and microbiological methods. *Food Chemistry*, **92**, 745–751.
202. Özogul, F., Polat, A., and Özogul, Y. (2004). The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*, **85**, 49–57.
203. Özogul, F., Taylor, K. D. A., Quantick, P., and Özogul, Y. (2002). Biogenic amines formation in Atlantic herring (*Clupea harengus*) stored under modified atmosphere packaging using a rapid HPLC method. *International Journal of Food Science and Technology*, **37**, 515–522.

204. Ozsoy, N., Candoken, E., and Akev, N. (2009). Implications for degenerative disorders: antioxidative activity, total phenols, flavonoids, ascorbic acid, beta-carotene and beta-tocopherol in *Aloe vera*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2**, 99–106.
205. Özyurt, G., Kuley, E., Balikçi, E., Kaçar, Ç., Gökdoğan, S., Etyemez, M., and Özogul, F. (2011). Effect of the Icing with Rosemary Extract on the Oxidative Stability and Biogenic Amine Formation in Sardine (*Sardinella aurita*) During Chilled Storage. *Food Bioprocess Technology*. DOI: 10.1007/s11947-011-0586-7.
206. Paarup, T., Sanchez, J. A., Moral, A., Christensen, H., Bisgaard, M., and Gram, L. (2002a). Sensory, chemical and bacteriological changes during storage of iced squid (*Todaropsis eblanae*). *Journal of Applied Microbiology*, **92**, 941–950.
207. Paarup, T., Sanchez, J. A., Pelaez, C., and Moral, A. (2002b). Sensory, chemical and bacteriological changes in vacuum-packed pressurised squid mantle (*Todaropsis eblanae*) stored at 4°C. *International Journal of Food Microbiology*, **74**, 1–12.
208. Pacheco-Aguilar, R., Lugo-Sanchez, M. E., and Robles-Burgueno, M. R. (2000). Post-mortem biochemical and functional characteristic of Monterey sardine muscle stored at 0 °C. *Journal of Food Science*, **65**, 40–47.
209. Pacheco-Aguilar, R., Lugo-Sanchez, M. E., Villegas-Ozuna, R. E., and Robles-Burgueno, R. (1998). Histamine quantification in Monterey sardine muscle and canned products from Northwestern Mexico. *Journal of Food Composition and Analysis*, **11**, 188–195.
210. Patterson, M. F. (1990). A review: The potential for food irradiation. *Letters in Applied Microbiology*, **11**, 55–61.
211. Paulus, K., Zacharias, R., Robinson, L., and Geidel, H. (1979). Kritische Betrachtungen Zur ‘‘Bewetenden Pru’’ fung Mit Skale’’ Als Einem Wesentlichen Verfahren Der Sensorischen Analyse. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, **12**, 52–61.

212. Pérez-Villarreal, B., Amarita, F., Bald, C., Pardo, M. A., and Sagardia, I. (2008). Validation of traceability in the seafood production chain. In: Borresen, T. (ed.), *Improving Seafood Products for the Consumer*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp 539–560.
213. Peters, F. N., and Musher, S. (1937). Oat flour as an antioxidant. *Industrial and Engineering Chemistry*, **29**,146–151.
214. Pezeshk, S., Rezaei, M., and Hosseini, H. (2011). Effects of turmeric, shallot extracts, and their combination on quality characteristics of vacuum-packaged rainbow trout stored at 4±1 °C. *Journal of Food Science*, **76**, M387–M391.
215. Pokorný, J. (1991). Review: Natural antioxidants for food use. *Trends in Food Science and Technology*, **2**, 223–227.
216. Potapovich, A. I., and Kostyuk, V. A. (2003). Comparative study of antioxidant properties and cytoprotective activity of flavonoids. *Biochemistry (Moscow)*, **68**, 514–519.
217. Quero, J. C., and Vayne, J. J. (1997). *Les poissons de mer des pêches françaises*. IFREMER, Brest: Edition Delachaux et Niestlé.
218. Quezel, P., et Santa, S. (1962). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Tome I. Editions du centre national de la recherche scientifique. Paris.
219. Ramarathnam, N., Ochi, H., and Takeuchi, M. (1997). Antioxidant defense system in vegetable extracts. In: Shahidi, F. (ed.), *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Applications*. AOCS Press, Champaign, IL, pp 76–87.
220. Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R., and Martin-Belloso, O. (2009). Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **8**, 157–180.
221. Rice, S. L., Eitenmiller, R. R., and Koehler, P. E. (1976). Biologically active amines in food: A review. *Journal of Milk and Food Technology*, **39**, 353–358.
-

222. Richards, M. P., Modra, A. M., and Li, R. (2002). Role of deoxyhemoglobin in lipid oxidation of washed cod muscle mediated by trout, poultry and beef hemoglobins. *Meat Science*, **62**, 157–163.
223. Rodriguez-Jerez, J. J., Lopez-sabater, E. I., Roig-sagues, A. X., and Mora-ventura, M. T. (1994). Histamine, cadaverine and putrescine forming bacteria from ripened Spanish semipreserved anchovies. *Journal of Food Science*, **59**, 998–1001.
224. Rodriguez, C. J., Besteiro, I., and Pascual, C. (1999). Biochemical changes in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chilled storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **79**, 1473–1480.
225. Rojas, M., and Brewer, S. (2007). Effect of natural antioxidants on oxidative stability of cooked, refrigerated beef and pork. *Journal of Food Science*, **72**, S282–S288.
226. Roller, S. (2003). *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
227. Ruiz-Capillas, C., and Jiménez-Colmenero, F. (2009). Biogenic Amines in Seafood Products. In: Nollet, L. M. L., and Toldora, F. (eds.), *Handbook of Seafood and Seafood Products Analysis*. Taylor and Francis Group, CRC Press, New York, pp 833–850.
228. Ruiz-Capillas, C., and Jimenez-Colmenero, F. (2004). Biogenic amines in meat and meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **44**, 489–599.
229. Ruiz-Capillas, C., and Moral, A. (2003). Free amino acids and biogenic amines in red and white muscle of tuna stored in controlled atmospheres. *Amino Acids*, **26**, 125–132.
230. Ruiz-Capillas, C., and Moral, A. (2001a). Production of biogenic amines and their potential use as quality control indices for hake (*Merluccius merluccius* L.) stored in ice. *Journal of Food Science*, **66**, 1030–1032.

231. Ruiz-Capillas, C., and Moral, A. (2001b). Effect of controlled atmospheres enriched with O₂ in formation of biogenic amines in chilled hake (*Merluccius merluccius L.*). *European Food Research and Technology*, **212**, 546–550.
232. Ruiz-Capillas, C., and Moral, A. (2001c). Formation of biogenic amines in bulk stored chilled hake (*Merluccius merluccius, L.*) packed under atmospheres. *Journal of Food Protection*, **64**, 1045–1050.
233. Ruiz-Capillas, C., and Horner, W. F. A. (1999). Determination of trimethylamine nitrogen and total volatile basic nitrogen in fresh fish by flow injection analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **79**, 1982–1986.
234. Saeedeh Arabshahi, D., Vishalakshi Devi, D., and Urooj, A. (2007). Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their heat, pH and storage stability. *Food Chemistry*, **100**, 1100–1105.
235. Sainclivier, M. (1983). *L'industrie alimentaire halieutique : le poisson, matière première*, vol. 1. Bulletin Scientifique et Technique de l'Ecole Nationale de Rennes.
236. Saito, T., Arai, K., and Matsuyoshi, M. (1959). A new method for estimating the freshness of fish. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, **24**, 749–750.
237. Santos, S. M. H. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, **29**, 213–231.
238. Saoudi, M., Allagui, M. S., Abdelmouleh, A., Jamoussi, K., and El Feki, A. (2010). Protective effects of aqueous extract of *Artemisia campestris* against puffer fish *Lagocephalus lagocephalus* extract-induced oxidative damage in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, **62**, 601–605.
239. Sato, T., Fujii, T., Masuda, T., and Okuzumi, M. (1994). Changes in number of histamine-metabolic bacteria and histamine content during storage of common mackerel. *Fisheries Science*, **60**, 299–302.

240. Schilter, B., Andersson, C., Anton, R., Constable, A., Kleiner, J., O'Brien, J., Renwick, A. G., Korver, O., Smit, F., and Walker, R. (2003). Guidance for the safety assessment of botanicals and botanical preparations for use in food and food supplements. *Food and Chemical Toxicology*, **41**, 1625–1649.
241. Schulz, M., Liese, A. D., Mayer-Davis, E. J., D'Agostino, R. B. Jr., Fang, F., Sparks, K. C., and Wolever, T. M. (2005). Nutritional correlates of dietary glycaemic index: New aspects from a population perspective. *British Journal of Nutrition*, **94**, 397–406.
242. Schwarz, K., Bertelsen, G., Nissen, L. R., Gardner, P. T., Heinonen, M. I., Hopia, A., Huynh-Ba, T., Lambelet, P., McPhai, D., Skibsted, L. H., and Tijburg, L. (2001). Investigation of plant extracts for the protection of processed food against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *European Food Research and Technology*, **212**, 319–328.
243. Serdaroglu, M., and Felekoglu, E. (2005). Effects of using rosemary extract and onion juice on oxidative stability of sardine (*Sardina pilchardus*) Mince. *Journal of Food Quality*, **28**, 109–120.
244. Shahidi, F., Amarowicz, R., Abou-Gharbia, H. A., Shehata, A., and Adel, Y. (1997). Endogenous antioxidants and stability of sesame oil as affected by processing and storage. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **74**, 143–148.
245. Shahidi, F., and Wanasundara, P. K. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **32**, 67–103.
246. Shalaby, A. R. (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, **29**, 675–690.
247. Shan, B., Yi-Zhong, C., Brooks, J. D., and Corke, H. (2009). Antibacterial and antioxidant effects of five spice and herb extracts as natural preservatives of raw pork. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **89**, 1879–1885.

248. Shewan, J. M. (1962). The bacteriology of fresh and spoiling fish and some related chemical changes. In: Hawthorn, J., and Muil Leitch, J. (eds.), *Recent advances in food science*. Butterworth, London1, pp 167–193.
249. Sierra-Alvarez, R., and Lettinga, G. (1991). The effect of aromatic structure on the inhibition of acetoclastic methanogenesis in granular sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **34**, 544–550.
250. Sikkema, J., De Bont, J. A. M., and Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, **59**, 201–222.
251. Sikorski, Z. E., Lolakowska, A., and Pan, B. S. (1990). The nutritive composition of the major groups of marine food organisms. In: Sikorski, Z. E. (ed.), *Resources Nutritional Composition and Preservation*. Boca Raton, CRC Press-Inc, Florida, pp 30–52.
252. Silla, M. H. (1996). Biogenic amines: Their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, **29**, 213–231.
253. Sims, G. G., Farn, G., and York, R.Y. (1992). Quality index for tuna correlation of sensory attributes with chemical indices. *Journal of Food Science*, **57**, 1112–1115.
254. Singleton, V. L., Orthofer, R., and Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. *Methods in Enzymology*, **299**, 152–178.
255. Smith, J. G. M., Hardy, R. S., McDonald, I., and Temhleton, J. (1980). The storage of herring (*Clupea harengus*) in ice, refrigerated sea water and at ambient temperature, chemical and sensory assessment. *Journal of Science of Food and Agriculture*, **31**, 375–385.
256. Smith, A. M., Hayden, M. A., McCay, S. G., Zapatka, F. A., and Hamdy, M. K. (1982). Detection and confirmation of histamine-producing bacteria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **29**, 618–623.

257. Stamatis, N., and Arkoudelos, J. (2007). Quality assessment of *Scomber colias japonicus* under modified atmosphere and vacuum packaging. *Food Control*, **18**, 292–300.
258. Stansby, M. E. (1962). Proximate composition of fish. In: Heen, E., and Kreuzer, R. (eds.), *Fish in nutrition*. Fishing News Books Ltd., London, 55–60.
259. Staruszkiewicz, W. F., and Rogers, P. L. (2001). *Performance of Histamine Test Kits for Applications to Seafood*. Presentation on October 26, 2001. 4th World Fish Inspection and Quality Control Congress, Vancouver, BC.
260. Stratford, M., and Eklund, T. (2003). Organic acids and esters. In: Russell, N. J., and Gould, G. W. (eds.), *Food Preservatives*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, London, pp 48–84.
261. Stratton, J. E., and Hutkins, W. R., and Taylor, S. L. (1991). Biogenic amines in cheese and other fermented foods. A review. *Journal of Food Protection*, **54**, 460–470
262. Suhaj, M. (2006). Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**,531–537.
263. Surh, Y. J. (1999). Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutation Research*, **428**, 305–327.
264. Takagi, K., and Shikata, S. (2004). Flow injection determination of histamine with a histamine dehydrogenase-based electrode. *Analytica Chimica Acta*, **505**, 189–193.
265. Talcott, S. T., Percival, S. S., Pittet-Moore, J., and Celoria, C. (2003). Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 935–941.
266. Tarladgis, B., Watts, B., Yonathan, M., and Dugan, L. (1960). Distillation method for determination of malonaldehyde in rancidity food. *Journal of American Oil Chemists' Society*, **371**, 44–48.
267. Taylor, S. L. (1986). Histamine food poisoning: Toxicology and clinical aspects. *Critical Reviews in Toxicology*, **17**, 91–128.

268. ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. L. J. and Huis in't Veld, J. H. J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, **11**, 73–84.
269. Terao, J., Piskula, M., and Yao, Q. (1994). Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **308**, 278–284.
270. Teti, D., Visalli, M., and McNair, H. (2002). Analysis of polyamines as markers of (patho) physiological conditions. *Journal of Chromatography B*, **781**, 107–149.
271. Thapa, N., Pal, J., and Tamang, J.P. (2006). Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas. *International Journal of Food Microbiology*, **107**, 33–38.
272. Thomas, R. H., Bernards, M. A., Drake, E. E., and Guglielmo, C. G. (2010). Changes in the antioxidant activities of seven herb- and spice-based marinating sauces after cooking. *Journal of Food Composition and Analysis*, **23**, 244–252.
273. Tokunaga, T. (1970). Trimethylamine oxide and its decomposition in the bloody muscle of fish. 1. TMAO, TMA and DMA contents in ordinary and bloody muscles. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, **36**, 502–509.
274. Tracy, M. L., Pickering M. V., and Verhulst, T. (1995). Cation-exchange analysis of foods and beverages for biogenic amines. *Food Testing and Analysis*, **1**, 48–50.
275. Tsai, Y. H., Lin, C. Y., Chang, S. C., Chen, H. C., Kung, H. F., Wei, C. I., and Hwang, D. F. (2005). Occurrence of histamine and histamine-forming bacteria in salted mackerel in Taiwan. *Food Microbiology*, **22**, 461–467.
276. Ultee, A., Slump, R. A., Steging, G., and Smid, E. J. (2000). Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *Journal of Food Protection*, **63**, 620–624.

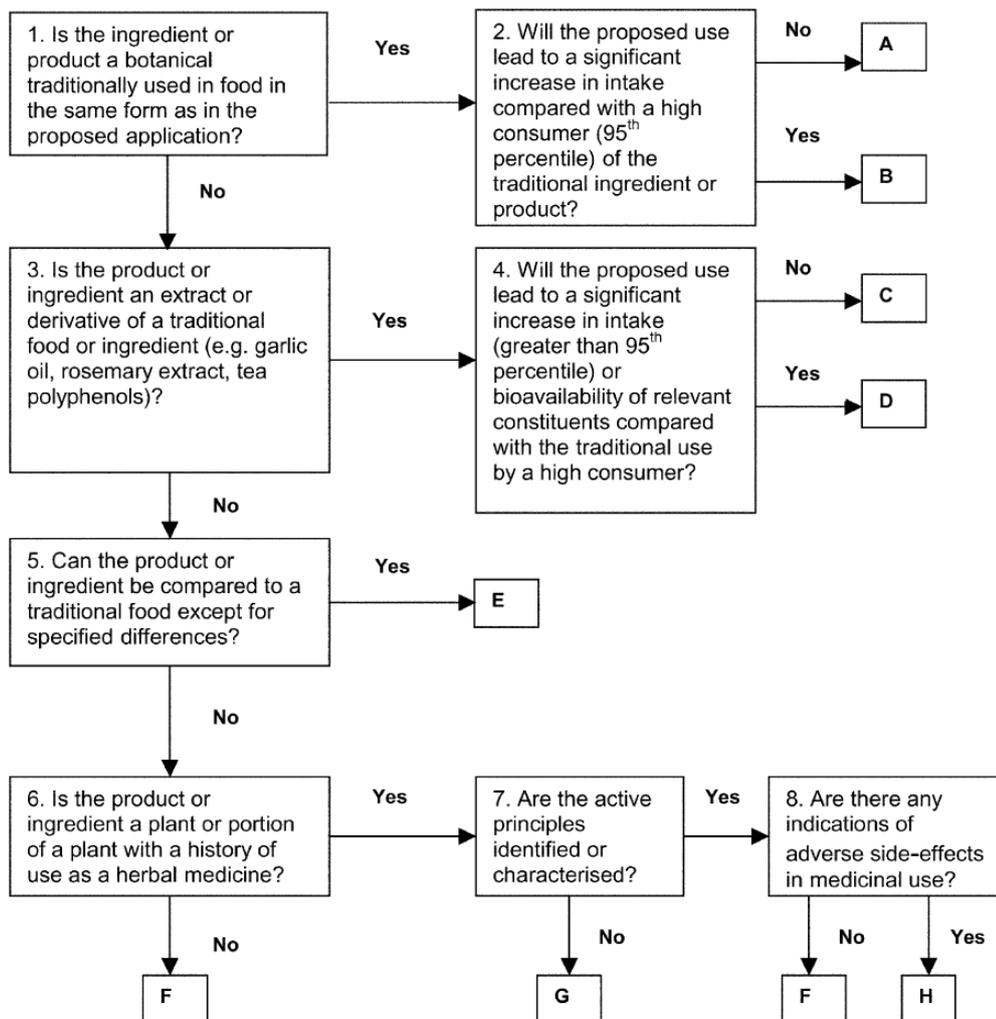
277. Vazquez, R. A., Graciani, C. E., and Maestro, D. R. (1974). Componentes fenolicos de la aceituna. I- polifenoles de la pulpa. *Grasas y Aceites*, **25**, 269–279.
278. Veciana-Nogues, M. T., Marine Font, A., and Vidal Carou, M. C. (1997). Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. Relationships with microbial counts, ATP-related compounds, volatile and organoleptic changes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 2036–2041.
279. Veciana-Nogues, M. T., Albala´-Hurtado, S., Marine-Font, A., and Vidal-Carou, M. C. (1996). Changes in biogenic amines during the manufacture and storage of semipreserved anchovies. *Journal of Food Protection*, **59**, 1218–1222.
280. Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., and Oomah, B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 4113–4117.
281. Vermeiren, L., Heirlings, L., Devlieghere, F., and Debevere, J. (2003). Oxygen, ethylene and other scavengers. In: Ahvenainen, R. (ed.), *Novel food packaging techniques*. Woodhead Publishing, Ltd., Cambridge. pp 22–45.
282. Visioli, F., Caruso, D., Grande, S., Bosisio, R., Villa, M., Galli, G., Sirtori, C., and Galli, C. (2004). Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidémie patients. *European Journal of Clinical Nutrition*, **6**, 1–7.
283. Watanabe, H., Yamanaka, H., and Yamanakawa, H. (1992). Post mortem biochemical changes in the muscle of disk abalone during storage. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 2081–2088.
284. Wendakoon, C. N., and Sakaguchi, M. (1992). Effects of spices on growth and biogenic amine formation by bacteria in fish muscle. In: Huss, H. H., Jakobsen, M., and Liston, J. (eds.), *Quality Assurance in the Fish Industry: Proceedings of an International Conference*. Elsevier, Amsterdam, pp 305–313.

285. Wendakoon, C. N., and Sakaguchi, M. (1995). Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of Food Protection*, **58**, 280–283.
286. Wendakoon, C. N., Murata, M., and Sakaguchi, M. (1990). Comparison of non-volatile amine formation between the dark and white muscles of mackerel during storage. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 809–818.
287. Wettasinghe, M., and Shahidi, F. (2000). Scavenging of reactive species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals. *Food Chemistry*, **70**, 17–26.
288. Williams, G. M. (1993). Inhibition of chemical-induced experimental cancer of synthetic phenolic antioxidants. In: Williams, G. M., Sies, H., and Baker, III. G. T., Erdmann, J. W. Jr., and Henry, C. J. (eds.), *Antioxidants: Chemical, physiological, nutritional and toxicological aspects*. Princeton, NJ: Princeton Scientific Press, pp 202-208.
289. Williams, G. M. (1994). Interventive prophylaxis of liver cancer. *European Journal of Cancer Prevention*, **3**, 89–99.
290. Yamanaka, H., Shiomi, K., and Kikuchi, T. (1987). Agmatine as a potential index for freshness of common squid (*Todarodes pacificus*). *Journal of Food Science*, **52**, 936–938.
291. Yatsunami, K., and Echigo, T. (1993). Changes in the number of halotolerant histamine-forming bacteria and contents of non-volatile amines in sardine meat with addition of NaCl. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, **59**, 123–127.
292. Yoo, K. M., Lee, C. H., Lee, H., Moon, B. K., and Lee, C. Y. (2008). Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry*, **106**, 929–936.

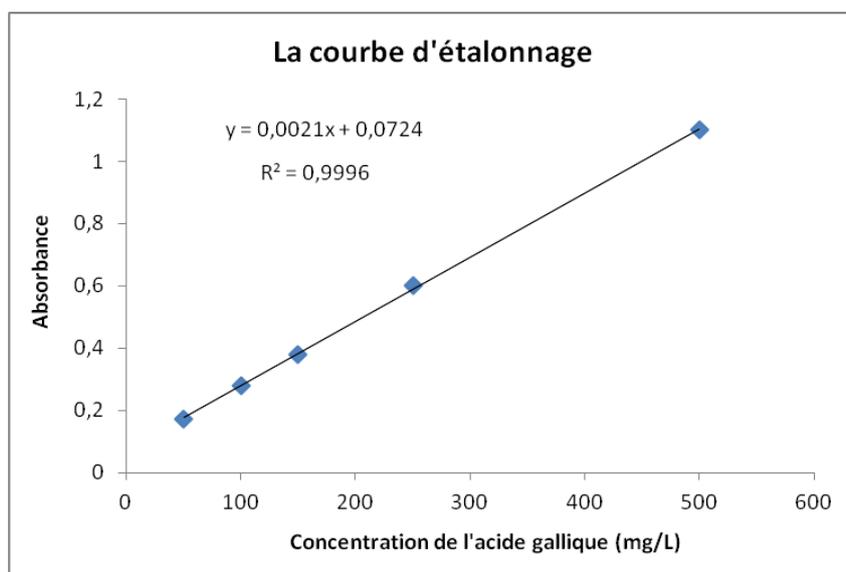
ANNEXES

ANNEXE n° 1

L'arbre de décision pour aider à déterminer les informations qui doivent être pris en considération pour l'évaluation de la sécurité d'un ingrédient végétal ou d'un produit (Schilter et al., 2003)



Scheme 1. Decision tree to assist in determining the information that needs to be considered for the safety evaluation of a botanical ingredient or product. Information required on herbal product as indicated by exit point of decision tree: A – I, II, III, IV; B – I, II, III, IV, VI, VII, VIII, (IX); C – I, II, III, IV, V; D – I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII (IX); E – I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX (particular emphasis on the reasons for, and significance of, the differences from traditional comparator e.g. changes due to process); F – I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX; G – The product needs to be characterised before a specification can be produced and a safety assessment made for its use in a food or as a food supplement; H – Do not add to food or use in supplements at intakes comparable to medicinal use without a comprehensive risk: benefit analysis. Summary of information required to demonstrate safety of botanical food supplements: I – Specification of the ingredient or product; II – Details of the source organism (Genus, species, portion of the plant consumed); III – Evidence from previous human exposure through food and/or other sources; IV – Extent of use and estimated intake; V – Technical details of any processing and stability in formulation; VI – Nutritional assessment (including assessment of any effects of the active principles on the bioavailability of other dietary components); VII – Toxicological assessment (including assessment of any effects of other dietary components on the bioavailability of the active components); there is not a check-list of essential toxicity tests, and the studies performed should be selected on a case-by-case basis; VIII – Human clinical data including variability of response, adverse effect reports and contra-indications; IX – Ancillary data (mode of action of beneficial effect to allow consideration of special studies, aggregate exposure, susceptible groups etc).

ANNEXE n° 2**La courbe d'étalonnage tracée avec de l'acide gallique**

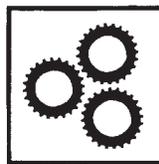
(y est la densité optique, x est la concentration de l'acide gallique et R^2 est le coefficient de corrélation)

ANNEXE n° 3**Milieu histidine décarboxylase de Niven modifié par Smith et al. (1982)**

Formule (en grammes par litre d'eau distillée)

L-histidine 2HCl	27
Extrait de levure	5
Chlorure de sodium (NaCl)	5
Tryptone	5
Carbonate de calcium (CaCO ₃)	1
Agar-agar	30
Violet de bromocrésol (0.6 g/100 ml d'éthanol 95%)	10 ml
pH = 5.25	

Journal of Food Protection



Effect of *Mentha spicata* L. and *Artemisia campestris* Extracts on the Shelf Life and Quality of Vacuum-Packed Refrigerated Sardine (*Sardina pilchardus*) Fillets

ABDERRAHMANE HOUICHER,^{1*} ESMERAY KULEY,² BADIS BENEDEDOUCHE,³ AND FATIH ÖZOGUL²

¹Department of Agriculture, Faculty of Science, Laghouat University, BP 37 G, Laghouat 03000, Algeria; ²Department of Fishing and Fish Processing Technology, Faculty of Fisheries, Cukurova University, 01330 Balcali, Adana, Turkey; and ³High National Veterinary School, BP 161 El Harrach, Algiers 16000, Algeria

Effect of *Mentha spicata* L. and *Artemisia campestris* Extracts on the Shelf Life and Quality of Vacuum-Packed Refrigerated Sardine (*Sardina pilchardus*) Fillets

ABDERRAHMANE HOUICHER,^{1*} ESMERAY KULEY,² BADIS BENDEDDOUCHE,³ AND FATI H ÖZOGUL²

¹Department of Agriculture, Faculty of Science, Laghouat University, BP 37 G, Laghouat 03000, Algeria; ²Department of Fishing and Fish Processing Technology, Faculty of Fisheries, Cukurova University, 01330 Balcali, Adana, Turkey; and ³High National Veterinary School, BP 161 El Harrach, Algiers 16000, Algeria

MS 13-118: Received 25 March 2013/Accepted 18 May 2013

ABSTRACT

The present study investigated the effects of ethanolic extracts obtained from *Mentha spicata* and *Artemisia campestris* on the shelf life and the quality of vacuum-packed sardine fillets stored at $3 \pm 1^\circ\text{C}$ for a period of 21 days. The three groups were tested were VC, control group; VM, group treated with 1% mint extract; and VA, group treated with 1% artemisia extract. The observed shelf life of sardine fillets was 10 days for control samples, whereas the combination of vacuum packaging with mint and artemisia extracts extended the product's shelf life to 17 days. Among the chemical indices determined, the thiobarbituric acid–reactive substances values were significantly lower in VM samples. Total volatile base nitrogen was maintained at low levels in VA samples until 17 days of chilled storage. Results of aerobic plate counts and coliform counts showed the existence of a reduced growth in VA group, whereas lactic acid bacteria did not show a significant difference among groups. Natural extract treatments combined with vacuum packaging showed lower microbiological and chemical indices, indicating that the presence of phenolic compounds in mint and artemisia extracts and the removal of oxygen in the pack retarded lipid oxidation and reduced the growth of microorganisms, which resulted in preventing spoilage and extending the product's shelf life.

Small pelagics account for approximately 50% of total Mediterranean catches (28). Sardine (*Sardina pilchardus*) is commercially an important fish species in many Mediterranean countries. Fatty fish such as sardine are extremely perishable and generally spoil faster than other muscle foods. A number of chemical agents that are products of microbial metabolism have been found associated with fish spoilage (27). Moreover, the highly unsaturated fatty acids commonly found in sardine are easily susceptible to oxidation, which results in rancid smell and taste, as well as alterations in texture, color, and nutritional value during storage (32).

Vacuum packaging (VP) and modified atmosphere packaging (MAP), along with refrigeration, have become increasingly popular preservation techniques, which have brought major changes in storage, distribution, and marketing of raw and processed products to meet consumer demands (33). VP and MAP systems have been widely adopted to exclude oxygen from the headspace. However, these physical methods of oxygen elimination do not always remove the oxygen completely. Some oxygen (0.1 to 2%) generally remains in the package, and even more remains when the food is porous. Moreover, the oxygen that permeates the packaging film during storage cannot be

removed by these techniques (41). These means are not always practical, because very little oxygen is needed to initiate and maintain the oxidation process. It is neither economical nor practical to remove traces of oxygen from foods; therefore, it is quite common to combine such methods with the use of antioxidants. The main justification for using an antioxidant is to extend the shelf life of foodstuffs and to reduce waste and nutritional losses by inhibiting and delaying oxidation (14).

The growing interest in substitution of synthetic antioxidants by natural antioxidants has fostered research on screening of plant materials in order to identify new compounds. Some bioactive components are phenolic or polyphenolic compounds of plant origins that interfere with the formation of free radicals, thus preventing the formation of hydroperoxides (37). Several studies have been carried out in order to identify natural phenolics that possess antioxidant activity. *Mentha spicata* L. is an aromatic plant belonging to the Lamiaceae family, commonly known as spearmint or garden mint (2). This family is a rich source of polyphenolic compounds and hence could possess strong antioxidant properties. Mint extract has good total phenolic and flavonoid contents and exhibits excellent antioxidant activity (23).

Artemisia campestris is a perennial scarcely aromatic herb belonging to Asteraceae family, widespread in the south of Algeria, commonly known as “dougout.” The

* Author for correspondence. Tel: +213-699618257; Fax: +213-29932698 and +213-29932109; E-mail: a.houicher@yahoo.fr.

ethanol-water and infusion extracts of *A. campestris* show high antioxidant activity, polyphenol, and flavonoid contents (1). In one study (16), *A. campestris* was the best inhibitor, its effect was far stronger than that of caffeic acid and was more than three times as high as ascorbic acid and two times higher than α -tocopherol efficiency.

Many studies have evaluated the antimicrobial and antioxidant activities of several plant extracts or essential oils on fish. However, limited reports exist regarding the antioxidant properties of *M. spicata* L. and *A. campestris* extracts; further, their applications in fish have not been studied. Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of mint and artemisia extracts on sensory, chemical, and microbiological changes of raw sardine fillets stored in VP at $3 \pm 1^\circ\text{C}$.

MATERIALS AND METHODS

Plant extract preparation. The aerial parts (leaves and stems) of artemisia (*A. campestris*) and mint (*M. spicata* L.) were collected in summer 2011 from the Laghouat and El bayed regions of Algeria, respectively. The plant material was air dried and stored at room temperature in the dark until use.

The dried aerial parts of artemisia and mint were steam distilled for 4 h in a flask of a steam distillation unit to remove essential oils. Then, steam-distilled leaves and stems were dried at room temperature until completely dried. Two hundred grams of dried material was extracted with 1,000 ml of 96% ethanol at 60°C for 2 h. The extraction was repeated to recover most of the phenolic compounds. After filtration, 40 g of active carbon was added to the extract. Active carbon was removed from the extract with Whatman filtration paper. Then, all ethanol was evaporated in a vacuum evaporator, and the residue was stored in the dark at -18°C until use (11, 24).

Determination of total phenolics. The amount of total phenolics in the extracts was determined according to the Folin-Ciocalteu procedure (38), with minor modifications. From each calibration solution, samples (mint and artemisia extracts) or blank, 50 μl was piped into separate tubes, and to each, 1.85 ml of ultrapure water was added. Then, 200 μl of the Folin-Ciocalteu reagent was added and allowed to stand at room temperature for 5 min. After that, 900 μl of sodium carbonate solution was added. The final mixture was shaken thoroughly and incubated at room temperature in a dark place for 2 h. Absorption at 765 nm was measured with a spectrophotometer (Lambda 25, PerkinElmer, Shelton, CT). The total phenolic contents were expressed as milligrams of gallic acid equivalent (GAE) per gram of (dry weight) sample by using a calibration curve with gallic acid (0 to 500 mg/liter; $y = 0.0021x + 0.0724$, $R^2 = 0.9996$, where y is the absorbance, x is the gallic acid concentration, and R^2 is the correlation coefficient). All determinations were performed in triplicate.

Sample preparation. Sardines (*S. pilchardus*) were caught in February 2012 from the northeastern Mediterranean Sea region of Turkey. They had been stored in ice for 6 h postcapture on arrival at the laboratory. The average weight and length of fish were 26.10 ± 2.54 g and 15.15 ± 0.92 cm, respectively. The fish were immediately gutted, beheaded, and filleted, without skin removal. After that, the fillets were washed with tap water and then were divided into three groups. Groups to be treated were immersed in 1 liter of sterile distilled water containing 10 g of sterilized

artemisia (VA group) or mint (VM group) extracts for 4 min. The control (VC group) was not treated with plant extracts and was only immersed in distilled sterile water. Untreated and treated groups were packaged in pouches of polyamide film (Polinas, Manisa, Turkey) by using a VP machine (RV50, Reepack, Italy). The thickness of the film was 90 μm , and water and oxygen permeability were 8.5 g/m^2 24 h and 160 cm^3/m^2 24 h, respectively.

All samples were stored at $3 \pm 1^\circ\text{C}$ for a period of 21 days. Sensory, chemical, and microbiological analyses were performed in triplicate on days 0, 3, 6, 8, 10, 14, 17, and 21.

Proximate composition. Lipid content was done according to the Blich and Dyer (8) method. Moisture content of fish was determined by the AOAC International (6) method. Total crude protein and ash were determined by using the Kjeldahl method (5) and the AOAC (6) method, respectively.

Sensory analysis. For sensory analysis, the Quality Index Method scheme developed by Bonilla et al. (9) for fresh cod (*Gadus morhua*) fillets, with minor modification, was used. The scheme consists of eight quality parameters (i.e., skin mucus; flesh texture, blood, odor, color, brightness, and gaping; and odor of extract). The scheme has four simple descriptors, scoring demerit points from 0 to a maximum of 3. Each parameter evaluated received scores in which 0 corresponded to very fresh fillets. The scores increased according to spoilage up to 3 for each parameter. The total sum of demerit points was 18. The panel consisted of seven regular assessors who were trained in fish quality assessment before the experiment. Triplicate samples were taken at regular intervals for sensory analysis. The panel members were asked to state whether the fish were acceptable for the determination of shelf life of sardine. Sensory evaluation for cooked fish fillets was carried out according to the Paulus et al. (35) sensory assessment scheme. Fish fillets were cooked in a microwave for 2 min (300 W) and then served to the panelists to assess. Panelists scored for color, odor, flavor, general acceptability, and texture, using a 9-point hedonic scale (from 1 = dislike extremely to 9 = like extremely).

Analytical methods. The pH values of sardine fillets were determined with a pH meter (315i, WTW GmbH, Weilheim, Germany). The sample was homogenized in distilled water in the ratio 1:10 (wt/vol), and the measurement was done by a pH meter. The total volatile basic nitrogen (TVB-N) content was determined according to the method of Antonacopoulos and Vyncke (4) and expressed as milligrams of TVB-N per 100 g of muscle. The value of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARs) was analyzed according to method of Tarladgis et al. (40) for sardine fillets to evaluate the oxidation changes during storage, and the results are expressed as the TBAR value in milligrams of malondialdehyde per kilogram of fish flesh. Free fatty acid (FFA) analysis, expressed as a percentage of oleic acid, was carried out by the American Oil Chemists Society method (3). Peroxide value (PV), expressed in milliequivalents of peroxide oxygen per kilogram of fat, was analyzed also according to the American Oil Chemists Society method (3).

Microbiological analysis. Triplicate samples were taken to estimate aerobic plate count (APC), lactic acid bacteria (LAB), and coliform count (CC) from each of the three different groups. Fish muscle (10 g) was mixed with 90 ml of sterile Ringer's solution (one-quarter strength) and then stomached (IUL, Barcelona, Spain) for 3 min. Further decimal dilutions were made, and then 0.1 ml of

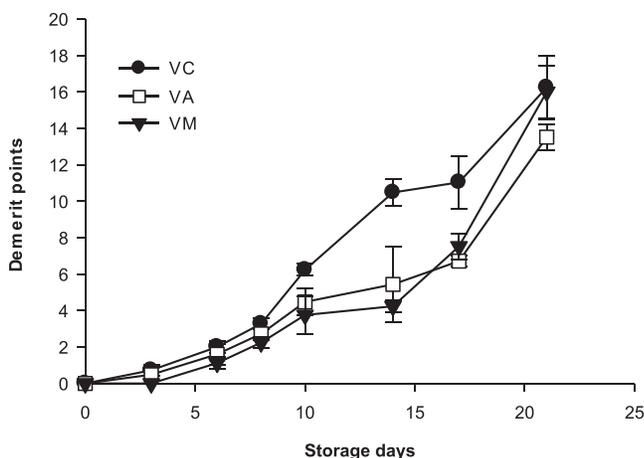


FIGURE 1. Sensory changes (demerit points) in raw sardine fillets during storage at 3°C under vacuum packaging without extract (VC, control group), vacuum packaging with 1% artemisia extract (VA), and vacuum packaging with 1% mint extract (VM).

each dilution was pipetted onto the surface of plate count agar (70152, Fluka, Steinheim, Switzerland) plates for determination of APC, and incubated at 30°C for 2 days. For LAB, 0.1 ml of each dilution was pipetted onto the surface of de Man Rogosa Shape agar (MRS; 69964, Fluka) and the plates covered with an overlay of MRS medium (2 to 3 mm). After solidification, plates were incubated for 5 days at 30°C. For CC, violet red bile agar (Oxoid, Ltd., Basingstoke, UK) was used and prepared according to the manufacturer's instructions. One-milliliter aliquots of each dilution were transferred to petri dishes by using the pour-plate method. They were incubated for 24 h at 30°C.

Statistical analysis. The mean value and standard deviation were calculated from the data obtained from the three samples for each treatment and for each specific storage time. Data were subjected to analysis of variance and Duncan's multiple range tests by using the SPSS, version 18.0, statistical package (SPSS, Inc., Chicago, IL).

RESULTS AND DISCUSSION

Total phenolic contents. The yield of mint and artemisia extracts were found to be 50 and 31.5 mg/g dried material, respectively. The total phenolic contents of mint and artemisia extracts were found to be 31.27 ± 3.36 and 57.8 ± 4.62 mg GAE/g (dry weight) sample, respectively. The total phenolic content of mint extract was found to be 25.62 ± 3.14 mg in terms of catechin equivalent per gram wet weight of the sample (23). Djeridane et al. (15) found that polyphenol contents in hydromethanolic extract of *A. campestris* was 40.92 mg GAE/g dry matter. In this study, the high total phenolic content was detected in *A. campestris* as compared with *M. spicata*. Quantification of phenolic compounds in plant extract is influenced by the chemical nature of the analyte, the extraction method used, sample particle size, and storage time and conditions, as well as assay method, selection of standards, and presence of interfering substances (30).

Proximate composition. Protein, lipid, moisture, and ash contents of sardine were $19.18\% \pm 0.01\%$, $9.6\% \pm$

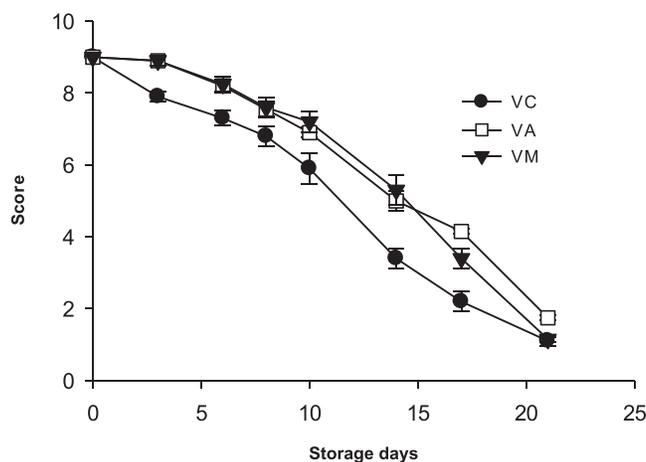


FIGURE 2. Sensory changes (score) in cooked sardine fillets during storage at 3°C under vacuum packaging without extract (VC, control group), vacuum packaging with 1% artemisia extract (VA), and vacuum packaging with 1% mint extract (VM).

0.11%, $69.59\% \pm 0.71\%$, and $1.63\% \pm 0.34\%$, respectively. Burt and Hardy (10) reported that the chemical composition of sardines was 57 to 78% water, 17 to 21% protein, and 1 to 21% lipid. The chemical composition of fish flesh varies widely not only within the same species, but also within individual fish depending on nutrition, living area, fish size, catching season, seasonal and sexual variations, as well as other environmental conditions (34).

Sensory assessment. Changes in the sensory quality of the raw sardine fillets stored in VP are presented in Figure 1. Sensory scores (demerit points) of raw fish increased with storage time in all groups stored in VP. There were significant differences between treated groups and control ($P < 0.05$) at 10, 14, and 17 days of chilled storage. It is noteworthy that the use of artemisia and mint extracts as "natural" preservative did not affect the natural initial odor and texture of sardine fillets stored in VP, as judged by the sensory panel. The limit of acceptability of raw fillets, based on sensory evaluation, was 10 days for control (VC) and 17 days for VM and VA samples. The application of 1% artemisia or 1% mint on fish provided a longer shelf life compared with the control. When fish was rejected by a panelist, demerit scores of raw fillets were found as 6.2 for control, 6.7 for VA, and 7.5 for VM samples. Özogul et al. (33) reported that sardines packaged in vacuum and stored at 4°C had 9 days of shelf life. In related studies, based on sensory evaluation, a shorter shelf life (12 days) was observed in vacuum-packaged sardine treated with 1 and 5% zeolite (25), although Kenar et al. (24) reported a longer shelf life (20 days) for vacuum-packaged sardine treated by 1% rosemary and 1% sage tea.

The sensory scores of cooked sardine stored in VP declined during storage time (Fig. 2). The present results showed a significant difference between the treated groups and control ($P < 0.05$) after 3 days of storage (except for 21 days). It must be noted that treated samples were highly preferred by sensory panelists because of their desirable odor and flavor, characteristic of fresh fish, and these

TABLE 1. pH, TVB-N, TBARs, PV, and FFA changes in sardine fillets during storage at 3°C under vacuum packaging without extract, vacuum packaging with artemisia extract 1%, and vacuum packaging with mint extract 1%^a

Storage day	pH	TVB-N (mg/100 g)	TBARs		PV (meq/kg)	FFA (oleic acid %)	Group
			(mg malonaldehyde/kg)				
0	6.40 ± 0.45	16.70 ± 0.04	0.56 ± 0.09		5.17 ± 1.47	2.36 ± 0.42	VC
3	6.88 ± 0.01 A ^b	16.60 ± 0.08 A	0.95 ± 0.17 A		5.09 ± 1.23 A	3.61 ± 1.80 A	VC
	6.93 ± 0.07 A	16.10 ± 0.79 A	0.44 ± 0.10 B		5.00 ± 1.65 A	2.60 ± 1.79 A	VA
	6.97 ± 0.07 A	16.09 ± 0.95 A	0.53 ± 0.18 B		5.08 ± 0.69 A	2.85 ± 1.23 A	VM
6	6.91 ± 0.07 A	23.82 ± 1.55 A	0.73 ± 0.10 A		7.37 ± 1.06 A	4.06 ± 1.18 A	VC
	6.93 ± 0.04 A	19.19 ± 2.32 B	0.50 ± 0.12 B		7.29 ± 1.23 A	2.82 ± 1.61 A	VA
	6.98 ± 0.02 A	20.50 ± 1.46 AB	0.49 ± 0.11 B		7.26 ± 0.93 A	3.51 ± 1.40 A	VM
8	6.94 ± 0.08 A	31.04 ± 3.03 A	0.51 ± 0.02 A		9.66 ± 0.89 A	4.51 ± 0.56 A	VC
	6.93 ± 0.01 A	22.29 ± 3.85 B	0.49 ± 0.01 A		9.59 ± 0.82 A	3.05 ± 1.43 A	VA
	6.99 ± 0.01 A	24.90 ± 1.97 B	0.44 ± 0.02 B		9.44 ± 1.17 A	4.17 ± 1.00 A	VM
10	6.83 ± 0.11 B	31.45 ± 0.01 A	0.61 ± 0.03 A		19.80 ± 2.98 A	5.07 ± 0.10 A	VC
	7.08 ± 0.01 A	24.90 ± 2.04 B	0.56 ± 0.15 AB		16.31 ± 3.47 A	4.23 ± 2.26 A	VA
	7.05 ± 0.02 A	30.40 ± 0.40 A	0.42 ± 0.03 B		17.22 ± 1.72 A	5.94 ± 0.81 A	VM
14	6.83 ± 0.01 A	35.04 ± 1.10 A	0.47 ± 0.02 B		21.56 ± 0.19 A	7.12 ± 1.80 A	VC
	6.91 ± 0.07 A	27.44 ± 1.93 C	0.86 ± 0.22 A		17.54 ± 2.96 A	5.59 ± 2.14 A	VA
	6.88 ± 0.11 A	30.60 ± 0.03 B	0.39 ± 0.03 B		19.12 ± 2.44 A	6.13 ± 0.31 A	VM
17	6.71 ± 0.01 B	47.22 ± 1.66 A	0.52 ± 0.01 A		23.81 ± 0.29 A	7.44 ± 1.05 A	VC
	6.93 ± 0.10 A	29.32 ± 2.74 B	0.60 ± 0.08 A		16.28 ± 4.78 A	5.92 ± 2.88 A	VA
	6.87 ± 0.15 AB	33.21 ± 2.27 B	0.31 ± 0.06 B		27.27 ± 6.00 A	7.08 ± 1.70 A	VM
21	7.08 ± 0.16 A	52.89 ± 4.80 A	0.59 ± 0.04 A		28.76 ± 2.18 A	8.93 ± 0.51 A	VC
	7.03 ± 0.01 A	37.27 ± 3.05 B	0.56 ± 0.08 A		25.17 ± 1.70 A	6.32 ± 1.26 B	VA
	6.99 ± 0.04 A	40.90 ± 5.08 B	0.39 ± 0.02 B		28.79 ± 2.88 A	7.24 ± 1.59 AB	VM

^a Values are means ± standard deviations ($n = 3$).

^b Different letters in a row indicate significant differences ($P < 0.05$) among groups.

samples were given the highest acceptability scores. Off-flavor and off-odor of the control and treated groups were detected on 10 and 17 days of chilled storage, respectively. When raw fish was deemed unacceptable, general acceptability scores for cooked sardine were found to be 5.9 for control, 4.1 for VA, and 3.4 for VM.

Chemical analysis. Changes in pH values of sardine fillets stored under VP conditions are shown in Table 1. The initial pH of sardine samples was 6.40 and increased slightly during storage time in all groups. On chilled storage, no significant differences in pH were observed among groups ($P > 0.05$). At the time of sensory rejection, the final values of pH were 6.83 for VC, 6.93 for VA, and 6.87 for VM samples.

TVB-N is a product of bacterial spoilage and endogenous enzymes action, and its content is often used as an index to assess the keeping quality and shelf life of products (19). Changes in TVB-N values of sardine fillets stored in VP are shown in Table 1. Initial TVB-N value for fresh sardine fillets was 16.70 mg/100 g, which is noticeably similar to the results reported by Kuley et al. (25), and lower than the results reported by Kenar et al. (24) for sardine held in cold temperature. Small differences in TVB-N values could be related to fish nonprotein nitrogen content, which in turn depends on the type of fish feeding, season of catching, fish size, and various environmental factors, as well as initial microbiological quality of fish tissue (33).

TVB-N levels of sardine samples increased gradually throughout the entire storage in all groups held under

vacuum. Significant differences were observed between control and VA group after 6 days of chilled storage ($P < 0.05$), of which the lowest TVB-N values were recorded for artemisia-treated samples until 17 days of storage (Table 1). Özogul et al. (33) found that the release of total volatile bases increased up to 15 mg/100 g for sardine stored in air, 19 mg/100 g for sardine in VP, and 17 mg/100 g in MAP on the last day of sensory acceptability for each storage condition. However, in the present study, higher TVB-N values were observed for treated groups at the rejection time, corresponding to the values of 29.32 mg/100 g for the VA group and 33.21 mg/100 g for the VM group, therefore at the limit value (25 to 35 mg of N per 100 g) for fishery products (19). The results of the present study show that the antimicrobial properties of phenolic compound present in *A. campestris* extract played a key role in maintaining TVB-N values at low levels in vacuum-packed sardine. In another related study, the initial TVB-N level was found to be 21.34 mg/100 g in vacuum-packed sardine stored at $3 \pm 1^\circ\text{C}$, and when fish was unacceptable for panelists, the lowest TVB-N value was recorded for rosemary and sage groups, corresponding to the values of 29.26 and 31.04 mg/100 g, respectively (24). Kuley et al. (25) found that the zeolite application in vacuum-packed sardine resulted in significant reduction in TVB-N values, except for groups treated with 5% zeolite at 15 days.

TBARs and PV are the major chemical indices to measure the degree of oxidative rancidity. Table 1 shows the TBAR values of refrigerated sardine fillets stored in VP. The initial value for fresh sardine fillets was 0.56 mg

malonaldehyde per kg, and its level showed fluctuation throughout the storage period in all groups. TBARs in sardine fillets ranged from 0.31 to 0.53 malonaldehyde per kg for the VM group and from 0.44 to 0.86 malonaldehyde per kg for the VA group. The results of the present study showed that TBAR values of mint-treated sardines (VM) were significantly lower than those of control samples ($P < 0.05$), except for at 14 days. Addition of 1% mint extract effectively reduced the TBAR values in fish muscle, which retarded the lipid oxidation and extended the product's shelf life. Kanatt et al. (23) reported that the extract of *M. spicata* retarded lipid oxidation, monitored as TBARs, in radiation-processed lamb meat and TBAR values of *M. spicata* containing irradiated meat stored at chilled temperatures were significantly lower ($P < 0.05$) than samples without *M. spicata*, as a result of the good total phenolic and flavonoid contents in mint extract. The major phenolic acids reported in water-soluble *M. spicata* extract are eriocitrin, luteolin glucoside, rosmarinic acid, and caffeic acid (17).

Initial PV of sardine samples was 5.17 meq/kg and increased throughout the entire storage period. It must be pointed out that the use of artemisia and mint extracts with VP conditions did not have a significant effect on the reduction of PV ($P > 0.05$) during chilled storage (Table 1). Smith et al. (39) and Cho et al. (12) found that initial PV values were 0.8 to 1.2 for herring and 27.6 for fresh sardine, respectively. Connell (13) noted that the fish can start to smell and taste rancid if the PVs fall within the range of 10 to 20 meq/kg. In the present study, PV in all groups remained below the 10 meq/kg until 8 days of storage time (Table 1). Peroxides are unstable and are rapidly transformed into secondary oxidation products such as TBARs. Our findings showed that PVs increased in all groups, whereas TBARs decreased in mint-treated sardine (VM group) after 8 days of storage. This was probably due to the antioxidant activity of phenolic acids present in mint extract, which inhibit the transformation of lipid hydroperoxides into TBARs during the oxidation process of polyunsaturated fatty acids. In postmortem stages, endogenous antioxidants of fish muscle are sequentially consumed for inhibiting lipid oxidation or they can be lost during processes such as washing or filleting. Their loss provokes a rapid increase of the rate of oxidation by concluding the induction period (22). Hemoglobin activation is also considered a major catalyzer of lipid oxidation in fish muscle of several fish species (36). It can be concluded that the stability of the product to lipid oxidation depends not only on O_2 -barrier properties of the polyethylene bags used in the packages, but also on the antioxidant activity of phenolic acids naturally present in plant extracts, which can retard the loss of endogenous antioxidants of fish muscle and inhibit hemoglobin auto-oxidation during chilled storage.

On chilled storage, the initial FFA value of sardine samples was found to be 2.36 (oleic acid percentage). No significant differences in FFA were observed among groups stored in VP ($P > 0.05$). It needs to be mentioned that the lowest FFA value (5.92 oleic acid percentage) was found in

artemisia-treated sardine samples (VA) at the rejection time. Similar to our findings, FFA values showed insignificant changes ($P > 0.05$) among the control and treated groups until 13 days of storage, of which the lowest FFA levels were found at the end of storage for vacuum-packed sardine fillets treated with rosemary and sage tea extracts (24). Likewise, Kuley et al. (25) reported that the application of natural zeolite (1 and 5%) in vacuum-packed sardine had no effect on FFA analysis.

Microbiological assessment. The changes in the microflora of sardine fillets during storage under VP conditions with or without the addition of mint and artemisia extracts are shown in Table 2.

The APC of sardine was 4.1 log CFU/g (day 0) and exceeded the value of 7 log CFU/g in all groups before the rejection time, which is considered as the upper acceptability limit for fresh water and marine species (21), on day 8 for VC and on day 10 for VA and VM (Table 2). Özogul et al. (33) reported that sensory evaluation showed a longer shelf life in sardines stored under VP and MAP when compared with microbiological assessment at 4°C. El-Marrakchi et al. (18) reported that initial APC of iced sardines was 3.16×10^2 CFU/g, reaching the limit counts of 10^6 to 10^7 CFU/g on day 9. Kuley et al. (25) found that the initial APC of sardine was 3.53 log CFU/g (day 0) and reached 9.71, 8.42, and 8.02 log CFU/g for the control, 1% zeolite, and 5% zeolite groups at the end of the storage period. In the current study, APC increased and its levels reached 7.93, 7.88, and 8.73 log CFU/g for the control, VA, and VM groups at the rejection time, respectively.

Analysis of coliforms is used as an indicator of the sanitary conditions during food processing. The initial CC of sardine fillets was 2.55 log CFU/g and increased with storage time for all groups (Table 2). Phenolic compounds are known to possess both antioxidant and antimicrobial properties. The effect of phenolic antioxidants on microbial growth and toxin production could be the result of the ability of phenolic compounds of altering microbial cell permeability, permitting the loss of macromolecules from the interior. They could also interact with membrane proteins, causing a deformation in its structure and functionality (20). However, the mechanisms of action of natural phenolic compounds have not been completely elucidated. Naili et al. (31) reported that methanolic leaves extracts of *A. campestris* showed reasonably high amounts of polyphenolics and alkaloids. In the present study, APC and coliforms changes showed the existence of a reduced growth in treated groups, the counts of which in VA group were significantly lower than control samples ($P < 0.05$) after 6 days of storage time. In addition, significant reductions in TVB-N values were observed for artemisia-treated sardine (VA group) until 17 days of chilled storage, as a result of the good polyphenolics and alkaloids contents in artemisia extract, which possess strong antimicrobial activity. Similar to our findings, microbiological results obtained by Kenar et al. (24) showed that natural compounds from rosemary and sage tea resulted in a lower bacterial growth in fish fillets during the storage period.

TABLE 2. APC, CC, and LAB changes in sardine fillets during storage at 3°C under vacuum packaging without extract, vacuum packaging with 1% artemisia extract, and vacuum packaging with 1% mint extract^a

Storage days	APC	CC	LAB	Group
0	4.10 ± 0.09	2.55 ± 0.07	2.2 ± 0.17	VC
3	4.96 ± 0.11 A ^b	3.79 ± 0.19 A	2.13 ± 0.18 A	VC
	4.85 ± 0.15 A	2.91 ± 0.39 B	2.13 ± 0.18 A	VA
	4.94 ± 0.10 A	3.63 ± 0.27 A	2.23 ± 0.22 A	VM
6	6.43 ± 0.07 A	4.18 ± 0.30 A	2.67 ± 0.31 A	VC
	5.64 ± 0.09 B	3.02 ± 0.26 C	3.11 ± 0.39 A	VA
	5.74 ± 0.19 B	3.66 ± 0.16 B	3.28 ± 0.24 A	VM
8	7.90 ± 0.04 A	4.58 ± 0.41 A	3.21 ± 0.45 B	VC
	6.43 ± 0.04 B	3.14 ± 0.13 C	4.10 ± 0.60 AB	VA
	6.54 ± 0.28 B	3.70 ± 0.06 B	4.33 ± 0.27 A	VM
10	7.93 ± 0.03 A	6.66 ± 0.26 A	4.08 ± 0.61 A	VC
	7.42 ± 0.16 C	5.45 ± 0.27 B	3.98 ± 0.29 A	VA
	7.74 ± 0.02 B	6.32 ± 0.24 A	3.95 ± 0.20 A	VM
14	8.64 ± 0.07 A	7.04 ± 0.09 A	3.93 ± 0.03 B	VC
	7.73 ± 0.07 B	6.80 ± 0.03 B	4.21 ± 0.07 A	VA
	7.94 ± 0.16 B	6.91 ± 0.04 B	4.28 ± 0.21 A	VM
17	8.69 ± 0.04 A	8.01 ± 0.13 A	4.26 ± 0.01 C	VC
	7.88 ± 0.06 B	6.96 ± 0.09 B	4.50 ± 0.09 B	VA
	8.73 ± 0.07 A	8.13 ± 0.06 A	4.69 ± 0.06 A	VM
21	9.89 ± 0.05 A	8.08 ± 0.05 B	4.34 ± 0.12 A	VC
	8.68 ± 0.34 C	7.62 ± 0.16 C	4.50 ± 0.09 A	VA
	9.24 ± 0.03 B	8.40 ± 0.05 A	4.54 ± 0.15 A	VM

^a Values are means ± standard deviations in log CFU per gram ($n = 3$).

^b Different letters in a row indicate significant differences ($P < 0.05$) among groups.

LAB compose the major component of the spoilage flora that develops on vacuum-packaged, lightly preserved fish products and hot-smoked fish products after a few weeks of storage at chilled temperatures (29). The initial LAB count of sardine fillets was 2.2 log CFU/g (day 0) and increased slightly throughout the storage time for all groups held in VP at $3 \pm 1^\circ\text{C}$ (Table 2). Use of artemisia and mint extracts with VP conditions did not show a significant effect on the growth of the LAB populations during chilled storage period ($P > 0.05$). Final populations of LAB did not exceed the level of 4.69 log CFU/g in all samples at the rejection time. Atrea et al. (7) found that the initial population of LAB in octopus was 3 log CFU/g, while only a count of 6.9 log CFU/g was reached for VP octopus samples on final day 23 of storage. Likewise, Kykkidou et al. (26) reported that the use of thyme oil with either air or MAP did not have a significant effect ($P > 0.05$) on the reduction of the LAB population.

In conclusion, natural extract treatment combined with VP showed lower microbiological and chemical indices, indicating that the presence of phenolic compounds in mint and artemisia extracts and the removal of oxygen in the pack retarded lipid oxidation, monitored as TBARs, and reduced the growth of microorganisms, which resulted in preventing spoilage and extending product shelf life.

REFERENCES

- Akrouf, A., L. A. Gonzalez, H. El Jani, and P. C. Madrid. 2011. Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia. *Food Chem. Toxicol.* 49: 342–347.
- Ali, M. S., M. Saleem, W. Ahmad, M. Parvez, and R. Yamdagni. 2002. A chlorinated monoterpene ketone, acylated β -sitosterol glycosides and a flavanone glycoside from *Mentha longigolia* (Lamiaceae). *Phytochemistry* 59:889–895.
- American Oil Chemists Society. 1994. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. American Oil Chemistry Society, Champaign, IL.
- Antonacopoulos, N., and W. Vyncke. 1989. Determination of volatile basic nitrogen in fish: a third collaborative study by Western European Fish Technologists' Association. *Z. Lebensm-Unters.-Forsch.* 189:309–316.
- Association of Official Analytical Chemists. 1984. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Analysis Chemists, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Atrea, I., A. Papavergou, I. Amvrosiadis, and I. N. Savvaidis. 2009. Combined effect of vacuum-packaging and oregano essential oil on the shelf life of Mediterranean octopus (*Octopus vulgaris*) from the Aegean Sea stored at 4°C. *Food Microbiol.* 26:166–172.
- Bligh, E., and W. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911–917.
- Bonilla, A., K. Sveinsdottir, and E. Martinsdottir. 2007. Development of quality index method (QIM) scheme for fresh cod (*Gadus morhua*) fillets and application in shelf life study. *Food Control* 18:352–358.
- Burt, J. R., and R. Hardy. 1992. Composition and deterioration of pelagic fish, p. 115–141. In J. R. Burt, R. Hardy, and K. J. Whittle (ed.), *Pelagic fish: the resource and its exploitation*. The University Press, Cambridge.
- Chen, Q., H. Shi, and C. T. Ho. 1992. Effects of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69:999–1002.
- Cho, S., Y. Endo, K. Fujimoto, and T. Kaneda. 1989. Oxidative deterioration of lipids in salted and dried sardines during storage at 5°C. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55:541–544.

13. Connell, J. J. 1975. Control of fish quality. Fishing News Books, Ltd., Surrey, UK.
14. Coppen, P. P. 1983. Use of antioxidants, p. 67–87. In J. C. Allen and R. J. Hamilton (ed.), Rancidity in foods. Applied Science Publishing Co., London.
15. Djeridane, A., M. Yousfi, J. M. Brunel, and P. Stocker. 2010. Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food Chem. Toxicol.* 48:2599–2606.
16. Djeridane, A., M. Yousfi, B. Nadjemi, N. Vidal, J. F. Lesgards, and P. Stocker. 2007. Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *Eur. Food Res. Technol.* 224:801–809.
17. Dorman, H. J. D., M. Kosar, K. Kahlos, Y. Holm, and R. Hiltunen. 2003. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 51:4563–4569.
18. El-Marrakchi, A. E., M. Bennour, N. Bouchaiti, A. Hama, and H. Tagafait. 1990. Sensory, chemical and microbiological assessment of Moroccan sardines (*Sardina pilchardus*) stored in ice. *J. Food Prot.* 53:600–605.
19. European Economic Community. 1995. Decision 95/149/EC: total volatile basic nitrogen (TVBN) limit values for certain categories of fishery products and specifying the analysis methods to be used. *Off. J. Eur. Union L* 097:84–87.
20. Fung, D. Y. C., S. Taylor, and J. Kahan. 1977. Effects of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus*. *J. Food Saf.* 1: 39–51.
21. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1986. Microorganisms in foods. Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications, vol. 2. University of Toronto Press, Toronto.
22. Jacobsen, C., I. Undeland, I. Storro, T. Rustad, N. Hedges, and I. Medina. 2008. Preventing lipid oxidation in seafood, p. 426–453. In T. Borresen (ed.), Improving seafood products for the consumer. Woodhead Publishing, Ltd., Cambridge.
23. Kanatt, S. R., R. Chander, and A. Sharma. 2007. Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chem.* 100:451–458.
24. Kenar, M., F. Özogul, and E. Kuley. 2010. Effects of rosemary and sage tea extracts on the sensory, chemical and microbiological changes of vacuum-packed and refrigerated sardine (*Sardina pilchardus*) fillets. *Int. J. Food Sci. Technol.* 45:2366–2372.
25. Kuley, E., F. Özogul, M. Durmus, S. Gokdogan, C. Kacar, Y. Özogul, and Y. Ucar. 2012. The impact of applying natural clinoptilolite (zeolite) on the chemical, sensory and microbiological changes of vacuum-packed sardine fillets. *Int. J. Food Sci. Technol.* 47:1977–1985.
26. Kykkidou, S., V. Giatrakou, A. Papavergou, M. G. Kontominas, and I. N. Savvaidis. 2009. Effect of thyme essential oil and packaging treatments on fresh Mediterranean swordfish fillets during storage at 4°C. *Food Chem.* 115:169–175.
27. Levin, R. E. 2010. Assessment of seafood spoilage and the microorganisms involved, p. 516–535. In L. M. L. Nollet and F. Toldora (ed.), Handbook of seafood and seafood products analysis. Taylor and Francis, CRC Press, New York.
28. Leonart, J. 2005. Mediterranean and Black Sea. FAO Statistical Area 37, p. 49–64. In Review of the state of world marine fishery resources. FAO Fisheries Technical Paper 457. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
29. Lyhs, U. 2009. Microbiological methods, p. 318–348. In H. Rehbein and J. Oehlenschläger (ed.), Fishery products, quality, safety and authenticity. Blackwell Publishing, Ltd., UK.
30. Naczki, M., and F. Shahidi. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 41:1523–1542.
31. Naili, M. B., R. O. Alghazeer, N. A. Saleh, and A. Y. Al-Najjar. 2010. Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). *Arab. J. Chem.* 3:79–84.
32. Olafsdottir, G. E., J. Martinsdottir, P. Oehlenschläger, B. Dalgaard, and I. U. Jensen. 1997. Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends Food Sci. Technol.* 8:258–265.
33. Özogul, F., A. Polat, and Y. Özogul. 2004. The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). *Food Chem.* 85:49–57.
34. Pachero-Aguilar, R., M. E. Lugo-Sanchez, and M. R. Robles-Burgueno. 2000. Post-mortem biochemical and functional characteristic of Monterey sardine muscle stored at 0°C. *J. Food Sci.* 65:40–47.
35. Paulus, K., R. Zacharias, L. Robinson, and H. Geidel. 1979. Kritische Betrachtungen zur “Bewertenden Prüfung Mit Skale” als einem Wesentlichen Verfahren der Sensorischen Analyse. *Lebensm-Wiss. Technol.* 12:52–61. (In German.)
36. Richards, M. P., A. M. Modra, and R. Li. 2002. Role of deoxyhemoglobin in lipid oxidation of washed cod muscle mediated by trout, poultry and beef hemoglobins. *Meat Sci.* 62:157–163.
37. Shi, J., L. S. Kassama, and Y. Kakuda. 2007. Supercritical fluid technology for extraction of bioactive components, p. 4–37. In J. Shi (ed.), Functional food ingredients and nutraceuticals: processing technologies. Taylor and Francis, CRC Press, New York.
38. Singleton, V. L., R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventos. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Method Enzymol.* 299:152–178.
39. Smith, J. G. M., R. S. Hardy, I. McDonald, and J. Temhleton. 1980. The storage of herring (*Clupea harengus*) in ice, refrigerated sea water and at ambient temperature, chemical, and sensory assessment. *J. Sci. Food Agric.* 31:375–385.
40. Tarladgis, B., B. Watts, M. Yonathan, and L. Dugan. 1960. Distillation method for determination of malonaldehyde in rancidity food. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 37:144–48.
41. Vermeiren, L., L. Heirlings, F. Devlieghere, and J. Debevere. 2003. Oxygen, ethylene and other scavengers, p. 22–45. In R. Ahvenainen (ed.), Novel food packaging techniques. Woodhead Publishing, Ltd., Cambridge.