

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université de Blida-1-



Faculté de Technologie

Département de Génie de Procédés

Mémoire de projet fin d'études en vue de l'obtention du diplôme

De Master

Option : Matériaux et Produits Organiques Industriels

Thème

**Valorisation des phytostérols extraits de l'huile d'olive vierge dans une formulation alimentaire diététique**

***Présenté par:***

***M<sup>elle</sup> BAKIR Zohra***

***Devant le jury:***

-M <sup>r</sup> Khodja Mohamed	professeur	UBLida 1	Président
-Mr.Boutoumi Hocine	MCA	UBLida 1	Examineur
-M <sup>r</sup> . Djalab Abdelkader	MAA	UBLida 1	Examineur
- M <sup>me</sup> Hadj- Ziane Amel	Professeur	UBLida 1	Promotrice

**Promoation 2013-2014**

# Dédicaces

*Tout d'abord je remercie mon Dieu tout puissant pour toutes les  
bénédictions.*

*&*

*Je tiens à faire un dédicace exceptionnelle pour une personne qu'elle  
est la plus chère au monde ma mère.*

*Je dédie aussi ce modeste travail à l'esprit de mon père, qui restera  
toujours dans mon cœur et pensé.*

*Je tiens aussi à exprimer mes profonds sentiments à:*

*A mes chers frères: Fethi. Fouzi.*

*Amon Oncle Mohamed et ton famille*

*A mes amis : Abdellah, Aïcha, Khadidja, Hayat, Houria, Nesrine.....*

*A tous ceux que j'aime et qui m'aime et toute la promotion de master*

*2013 - 2014.*



**Zohra**

## Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier Dieu Tout- Puissant, pour m'avoir donné la force et la patience.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de génie chimique du département de chimie industrielle à l'université de Blida

Je tiens à remercier en premier lieu M<sup>me</sup> Hadj-Ziane.A, Professeur à l'université de Blida, pour avoir accepté de m'encadrer et de diriger ce projet de fin d'études ainsi que pour ses conseils et orientation, qu'il trouve ici l'expression de ma

Profonde gratitude.

Je tiens à remercier aussi M<sup>ell</sup> F.Benaouadj, Ma co-promotrice pour ses conseils, ses discussions enrichissantes, ses orientations et ses encouragements.

Je remercie vivement le Directeur de production (Bellat), pour son assistance à la réalisation des essais de formulation de la margarine.

Je remercie sincèrement les membres du Jury pour avoir accepté et pris le temps de juger ce travail.

Je tiens à remercier aussi tous ce qui a contribué de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Finalement je remercie toute ma famille, mes amis et mes collègues.

## *Résumé*

Le présente travail porte sur la caractérisation de l'huile d'olive vierge et la valorisation de ses extraits insaponifiables par incorporation dans la formulation d'une margarine allégée.

Les caractérisations physico-chimiques de l'huile d'olive étudiée ont mis en évidence les principaux critères de qualité de l'huile d'olive telque l'acidité, indice d'acide, indice de saponification, indice de réfraction, indice de peroxyde, qui lui confère la qualité d'huile d'olive vierge.

La formulation moyennant le plan d'expériences a permis d'optimiser douze recettes présentant des caractéristiques physico-chimiques (l'acidité, pH, humidite, point de fusion) conformes à des formulation de référence de bonne qualité.

L'analyse micribiologique de la margarine formulée révèle l'absence totale des micro-organismes et la stabilité à l'altération, effet probablement accentué par l'ajout des extraits de l'huile d'olive vierge..

**Mots clés :** Huile d'olive vierge, extraits, phytostérols, valorisation, margarine.

## Summary

Present the work concerns the characterization of the virgin olive oil and the valorization of its extracts insaponifiables by incorporation in the formulation of a reduced margarine.

The physicochemical characterizations of the studied olive oil highlighted the principal quality standards of the olive oil acidity, acid value, index of saponification, index of refraction, index of peroxide, which confers to him the quality of virgin olive oil.

The formulation with the help of the experimental design made it possible to optimize twelve receipts presenting of the physicochemical characteristics (acidity, pH, humidite, point melting) in conformity to of the formulation of reference of good quality.

The microbiologic analysis of the formulated margarine reveals the total absence of the microorganisms and stability with deterioration, effect probably accentuated by the addition of extract from the virgin olive oil.

**Key words:** Virgin olive oil, extracts, phytosterols, valorization, margarine.

## الملخص

في هذا العمل قمنا بدراسة التركيبية الفيزيوكيميائية لزيـت الزيتون البكر و هذا من اجل استعمال مستخلص *Insaponifiable* في صياغة المارجرين. البنية الفيزيوكيميائية لزيـت الزيتون اعطت المعايير الرئيسية لجودة الزيتون التالية: الحموضة، وقيمة حامض و القيمة التصبن، معامل الاكسار ثابت البيروكسيد التي تمنح جودة الزيتون البكر. صياغة من  $\square$  لال التصميم التجريبي اثنا عشر و صفة يعطي الخصائص الفيزيوكيميائية التالية: الحموضة و pH و الرطوبة و درجة  $\square$  صهار. هذه المواصفات تعطي  $\square$  و عية جيدة. التحليل الميكروبيولوجي للماجرين عن الغياب الكلي للكائنات الدقيقة و الاستقرار التغير و هذا راجع ربما الى اضافة مستخلص من زيت الزيتون البكر

**الكلمات الدالة:** زيت الزيتون البكر، استخراج فيتوسترل، ثمين، الماجرين

# Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Abréviations

Introduction .....1

## **Chapitre I : Huile d'olive**

I.1. Généralités sur l'olivier.....3

I.1.1. Historique.....3

I.1.2. Répartition du verger oléicole dans le monde.....3

I.1.3. Principales variétés d'olivier cultivées en Algérie.....4

I.1.4. Morphologie et description botanique de l'olivier.....5

I.2. Description et morphologie de l'olive (fruit).....6

I.2.1. Composition chimique de l'olive.....6

I.3. Les huiles d'olive.....7

I.3.1. Différents types des huiles d'olives.....7

I.3.2. Composition chimique des huiles d'olive.....8

I.3.3. Méthode d'extraction des huiles d'olive.....11

## **Chapitre II : Insaponifiable et phytostérols**

II.1. Insaponifiable.....15

II.1.1. Définition .....15

II.1.2. Composition chimique d'insaponifiable.....16

II.2. Les phytostérols.....16

II.2.1. Définition .....16

II.2.2. Structure.....17

II.2.3. Les effets des phytostérols .....18

### **Chapitre III : La margarine**

III.1. Définition de la margarine.....	19
III.2. Définition d'une émulsion .....	19
III.3. Les différents types de margarine.....	19
III.4. Fabrication de la margarine.....	20
III.4.1. Préparation de la phase grasse.....	21
III.4.2. Préparation de la phase aqueuse.....	21

### **Chapitre IV : Matériels et méthodes**

IV.1. Matériels.....	24
IV.1.1. Matériels végétales.....	24
IV.1.2. Matériels de laboratoire.....	24
IV.2. Méthodes.....	24
IV.2.1. Caractérisation physico-chimique de l'huile d'olive.....	24
IV.2.2. Extraction des phytostérols.....	28
IV. 2. Elaboration et caractérisation d'une margarine diététique à base d'extraits.....	30

### **Chapitre V : Résultats et discussion**

V.1. Caractérisation physico-chimique de l'huile d'olive.....	39
V.2. Elaboration et caractérisation d'une margarine.....	40
V.2.1. Caractérisation physico-chimique de la margarine.....	40
V.2.2. Etude de la stabilité microbiologique de la margarine diététique formulée.....	42
V.2.3. Tests organoleptiques.....	44
Discussion générale.....	47
Conclusion.....	48

Référence bibliographique

Annexe

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.1</b> : Composition chimique de l'olive .....	6
<b>Tableau I.2</b> : Teneurs en acides gras en pourcentage par rapport aux acides gras totaux.....	9
<b>Tableau I.3</b> : Structure des tocophérols.....	10
<b>Tableau II.1</b> : Teneur en insaponifiable de quelques huiles végétales.....	15
<b>Tableau II.2</b> : Teneur en phytostérols de divers aliments.....	18
<b>Tableau IV.1</b> : plan d'expérience.....	32
<b>Tableau V.1</b> : Résultats des caractérisations physico-chimique de l'huile d'olive .....	39
<b>Tableau V.2</b> : la teneur en eau dans les différents essais.....	(Annexe 3)
<b>Tableau V.3</b> : Les valeurs du Point .....	..(Annexe 3)
<b>Tableau V.4</b> : L'acidité des différents essais.....	(Annexe 3)
<b>Tableau V.5</b> : les valeurs de pH pour chaque essai.....	(Annexe 3)
<b>Tableau V.6</b> : Résultats des l'analyse microbiologique.....	43

## Liste des figures

<b>Figure I.1:</b> Principaux pays producteurs en 2005.....	3
<b>Figure I.2 :</b> Répartition de la superficie d'olivier en Algérie.....	4
<b>Figure I.3 :</b> Composition physique d'olive.....	6
<b>Figure I.4 :</b> structure générale d'un tocophérol.....	9
<b>Figure I.5 :</b> structure générale d'un squaléne.....	10
<b>Figure I.6 :</b> Broyeurs à marteaux.....	12
<b>Figure I.7 :</b> Bacs de malaxage (a) unique, (b) trois bacs en série.....	12
<b>Figure I.8 :</b> Presse hydraulique.....	13
<b>Figure I.9 :</b> Centrifugeuse verticale.....	13
<b>Figure II.1:</b> Réaction d'hydrolyse alcaline (saponification) des corps gras.....	16
<b>Figure II.2 :</b> Structure chimique du cholestérol et des principaux phytostérols.....	17
<b>Figure III.1 :</b> Diagramme de fabrication de la margarine.....	23
<b>Figure IV.1 :</b> Extraction des pyhtostérols.....	29
<b>Figure IV.2 :</b> Diagramme de fabrication de la margarine diététique.....	33
<b>Figure V.1 :</b> La teneur en eau dans les différents essais.....	40
<b>Figure V.2 :</b> Les valeurs du point de fusion .....	41
<b>Figure V.3 :</b> L'acidité des différents essais.....	41
<b>Figure V.4 :</b> Variation du pH durant dix jours.....	42
<b>Figure V.5 :</b> Photographie des formulations établies.....	45

## Liste des abréviations

AFNOR: Association Française de normalisation

C : concentration

C° : degré Celsius

COI : Conseil oléicole international

CEE: Communauté Economique Européenne

EFSA: Autorité Européenne de Sécurité des aliments

FDA: Food and Drug Administration

g: gramme

g/mole: gramme par mole

ha: hectare

h: Heure

IP: Indice de peroxyde (meq/Kg)

ISO: International Standard Organisation

Kg: Kilogramme

L: Litre

M: Masse molaire (g/mole)

m: Mètre

mg: Milligramme

ml: Milliliter

mn: Minute

mole: Nombre de mole

N: Normalité

NPP: Nombre le plus probable

pH: potentiel d'hydrogène

ppm: partie par million

T: température

V: Volume

VBL: Bouillon lactose bilié au vert brillant

%: pourcentage

µg: micro-gramme.

# Introduction

---

L'huile d'olive est un élément clé du régime Méditerranéen. Très présente dans l'alimentation de ces pays et préconisée par de nombreux diététiciens, elle a acquis une place essentielle dans la recherche sur ses propriétés médicinales et cosmétiques.

Toutes les études démontrent que les régimes alimentaires à base d'huile d'olive sont bénéfiques pour la santé humaine en diminuant le risque de plusieurs maladies.

Ces bienfaits ont été liés l'un ou l'autre à sa composition en acides gras bien-équilibrée, où l'acide oléique est le composant principal et où à la présence des biomolécules mineures.

Le phytostérol est l'un des biomolécules qui a des effets sur le taux de cholestérol sanguin, grâce à sa structure proche de celle du cholestérol en rentrant en compétition avec ce dernier dans l'intestin et empêchent son absorption. D'autres effets biologiques des phytosterols sont actuellement sous investigation. Des preuves naissantes leur confèrent des effets inhibiteurs sur le développement de certaines formes de cancer. En plus les études démontrent que les phytostérols améliorent l'apparence de la peau avec l'empêchement de la dégradation de collagène.

Un aliment enrichi est un aliment auquel on a ajouté des vitamines, des minéraux ou des substances nutritionnelles (comme des Oméga-3) afin de prévenir, auprès du consommateur, certaines carences ou des problèmes de santé associés à celles-ci.

la margarine est un produit utilisé le plus souvent pour remplacer le beurre, constitué par une émulsion stabilisée d'huiles, de graisses animales ou surtout végétales et d'eau, à laquelle on ajoute diverses substances telles des vitamines et des matières colorantes. Il existe plusieurs types de margarine enrichie tel que celle enrichie en vitamine D, en oméga 3 et pourquoi pas en phytostérols. Le choix de l'huile d'olive est dicté par la richesse de notre pays en cette matière végétale très appréciée par les populations et par sa richesse en phytostérols.

Dans ce cadre précis, nous avons entrepris cette première partie d'un travail de recherche sur l'extraction par solvant des phytostérols à partir d'une huile d'olive vierge dans le but de l'incorporer dans une margarine diététique moyennant la stratégie expérimentale des plans d'expériences

Le présent mémoire a été structuré en deux parties principales :

## Introduction

---

- Une théorie dans laquelle sont regroupées les notions théoriques sur l'huile d'olive et sur les procédés d'extraction
- Une partie expérimentale dans laquelle sont présentés les méthodes de caractérisation physico-chimique de l'huile d'olive, l'extraction des insaponifiables, le plan de formulation de la margarine diététique ainsi que l'étude de la stabilité microbiologique de la margarine formulée.
- Les résultats trouvés ont été interprétés dans une partie résultats et discussion
- Enfin une conclusion générale achèvera ce mémoire avec des recommandations et perspectives pour la poursuite de ce travail qui est toujours en cours.

## I.1. Généralités sur l'olivier.

### I.1.1. Historique.

L'olivier est au centre de nombreuses légendes et a beaucoup inspiré la mythologie Grecque. Si la présence de l'olivier sauvage remonte aux alentours de 6000 av. JC, en Asie mineure, sa culture ne serait apparue que vers 3000 av. JC, en Palestine, en Syrie et en Phénicie.

C'est en Grèce, à travers l'Anatolie, que l'olivier s'est surtout développé, avant de s'étendre vers la Crète et l'Égypte, puis vers l'ensemble du bassin Méditerranéen. Les Grecs ont implanté l'olivier en Corse, en Sardaigne, en Sicile et dans toute l'Italie ainsi qu'en Gaule, par la ville de Marseille, en 600 av. JC [10].

### I.1.2. Répartition du verger oléicole dans le monde

La production de l'huile d'olive a toujours été concentrée dans les pays du pourtour Méditerranéen : Espagne, Portugal, Italie, Grèce, Turquie, Tunisie et Maroc. A eux seuls, ces pays représentent plus de 90% de la production mondiale.

L'évolution de la production mondiale est représentée sur le graphique ci-dessous (Figure I.1).

La tendance de la production par pays est globalement à la hausse, mais en terme de fluctuation, force de constater la grande influence des deux principaux pays producteurs. En effet, les productions de l'Italie et de l'Espagne varient beaucoup plus que celles de la Grèce et des autres pays en général, d'où une fluctuation similaire des quantités disponibles au niveau mondial [18].

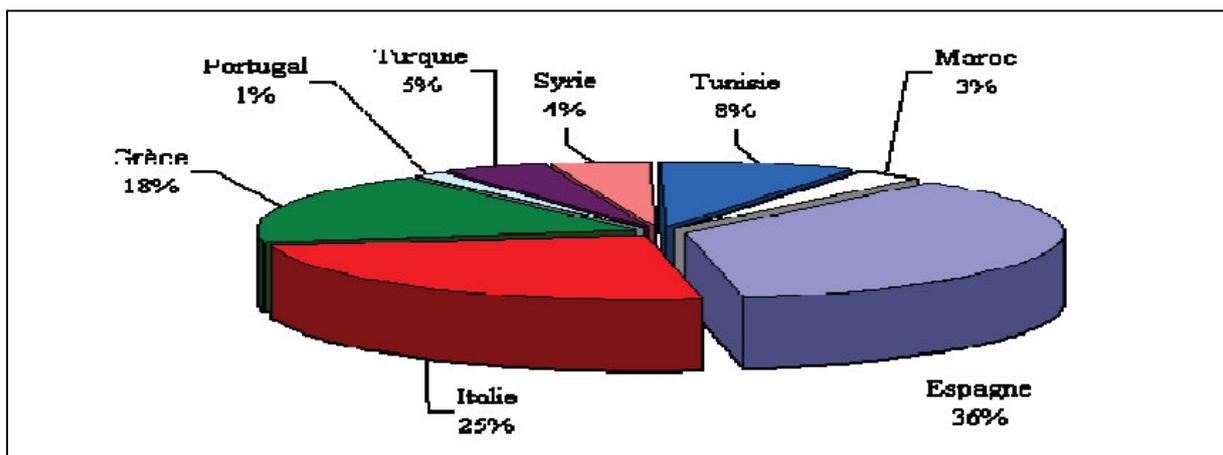


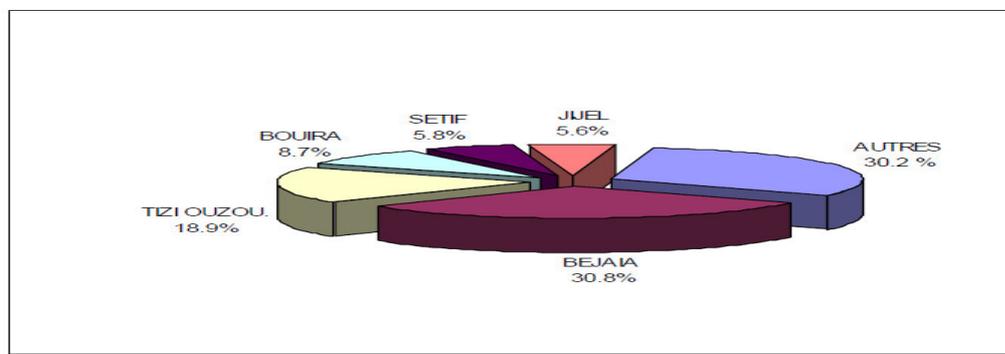
Figure I.1: Principaux pays producteurs en 2005[18].

### ✓ En Algérie

Au niveau national, la surface oléicole actuelle est de 207 822ha, avec 20.500.000 arbres complantés, dont un peu plus de 16 millions en production.

Cette surface est répartie notamment sur les zones est et centre-est du pays en particulier Bejaia, Tizi Ouzou, Bouira, Bordj-Bauarreridj, Sétif et Jijel, qui représentent ensemble à elles seules près des 2/3 de la superficie totale (figure I.2).

- Le centre : 112.921ha.
- L'est : 58.764ha.
- L'ouest : 35.192ha.
- Le Sud : 945ha [46].



**Figure I.2:** Répartition de la superficie d'olivier en Algérie [46].

### I.1.3. Principales variétés d'olivier cultivées en Algérie

L'étude des variétés d'olivier cultivées en Algérie à fait l'objet de plusieurs travaux .Nous réprésentons ci-après la répartition de ces variétés de base selon les principales régions oléicoles Algériennes [68].

#### a) Variétés de Kabylie

- **Chemlal** : c'est l'une des plus estimées pour la fabrication de l'huile. Le poids moyen du fruit est de 2.5g.
- **Azeradj ou adjeraz** : elle est très estimée pour la conserve en vert, mais moins recommandée pour l'huilerie.
- **Limli** : destinée essentiellement à la production d'huile. Le poids moyen du fruit est de 2g.

#### b) Variétés de l'est (Constantine, Annaba, Guelma)

- **Rougette** : variété connue pour son huile douce avec des olives de table rouges, débordent jusqu'à la Mitidja.

- **Blanquette** : complément de la rougette pour l'huilerie.

### c) Variétés d'Oranie

- **Sigoise** : est de beaucoup la plus appréciée, variété qui forme la majeure partie de nos olives de conserve pour l'exploitation, elle dérive de la picholine Française.

### I.1.4. Morphologie et description botanique de l'olivier

L'olivier est un arbre appartenant à la famille des oléacées dans l'ordre botanique des ligustrales qui comprend près de 30 genres et 500 espèces comme le jasmin, le lilas, le forsythia, le frêne, le troène [64]. C'est un arbre de hauteur faible (8-15m), à bois dur, à écorces crevassées et de couleur gris [15].

Le genre **Olea** comporte jusqu'à 30 espèces et sous espèces. La seule espèce portant des fruits comestible est *Olea europaea* [4.35].

On distingue deux sous –espèces:

- ***Olea europaea sativa*** (olivier cultivé)
- ***Olea europaea oleaster*** (olivier sauvage ou oléastre)

[49].

D'après (Argenson et Régis ,1999), la systématique de l'olivier peut être résumée comme suite :

Embranchement : Phanérogames

Sous Embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Série : Terbinthales

Ordre : Ligustrales

Famille : Oléacées

Genre : *Olea*

Espèce : *europaea*

Sous espèce : *Saliva*.



L'arbre d'olivier

## I.2. Description et morphologie de l'olive (fruit)

Le fruit est une drupe ovoïde ou ellipsoïde. Elle est constituée d'un épicarpe ; d'un mésocarpe et d'un endocarpe (Figure I.3).

- L'épicarpe qui est en fait la peau de l'olive. Elle est recouverte d'une matière cireuse, la cuticule, qui est imperméable à l'eau.
- Le mésocarpe est la pulpe du fruit, elle est constituée de cellules dans les quelles sont stockées les gouttes de graisses qui forment l'huile d'olive.
- L'endocarpe est le noyau [26].

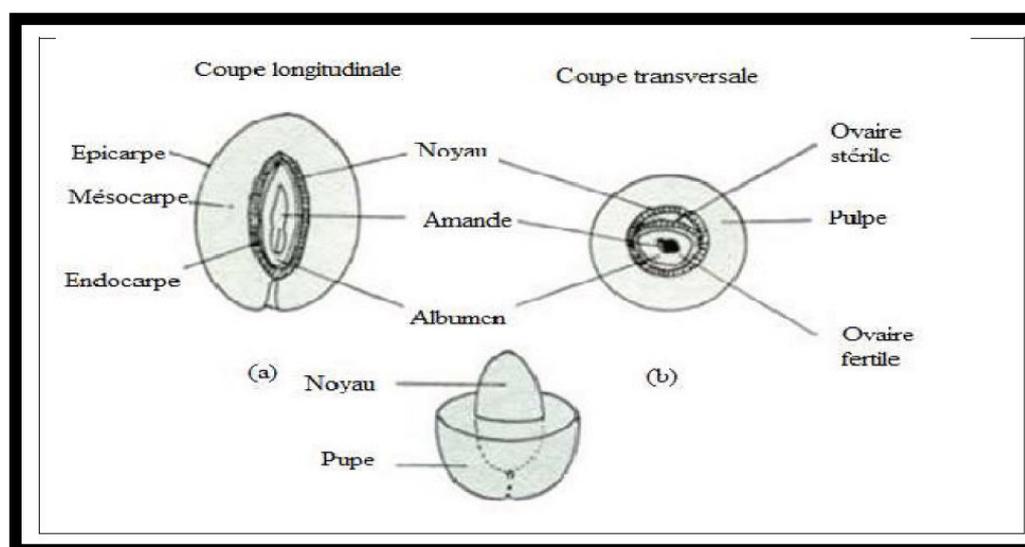


Figure I.3 : Composition physique d'olive [26].

### I.2.1. Composition chimique de l'olive

Les principaux constituants chimiques de l'olive se répartissent de façon différente selon les parties anatomiques. Cette répartition est illustrée sur le tableau I.1 [52].

Tableau I.1: Composition chimique de l'olive [52].

Partie anatomique	Constitution %				
	Eau	Lipides	Protides	Glucides	Cendres
Epicarpe+mésocarpe	24.2	56.40	6.8	9.9	2.66
Coque du noyau	4.2	5.25	15.6	70.3	4.16
Amande	6.2	12.26	13.8	65.6	2.16

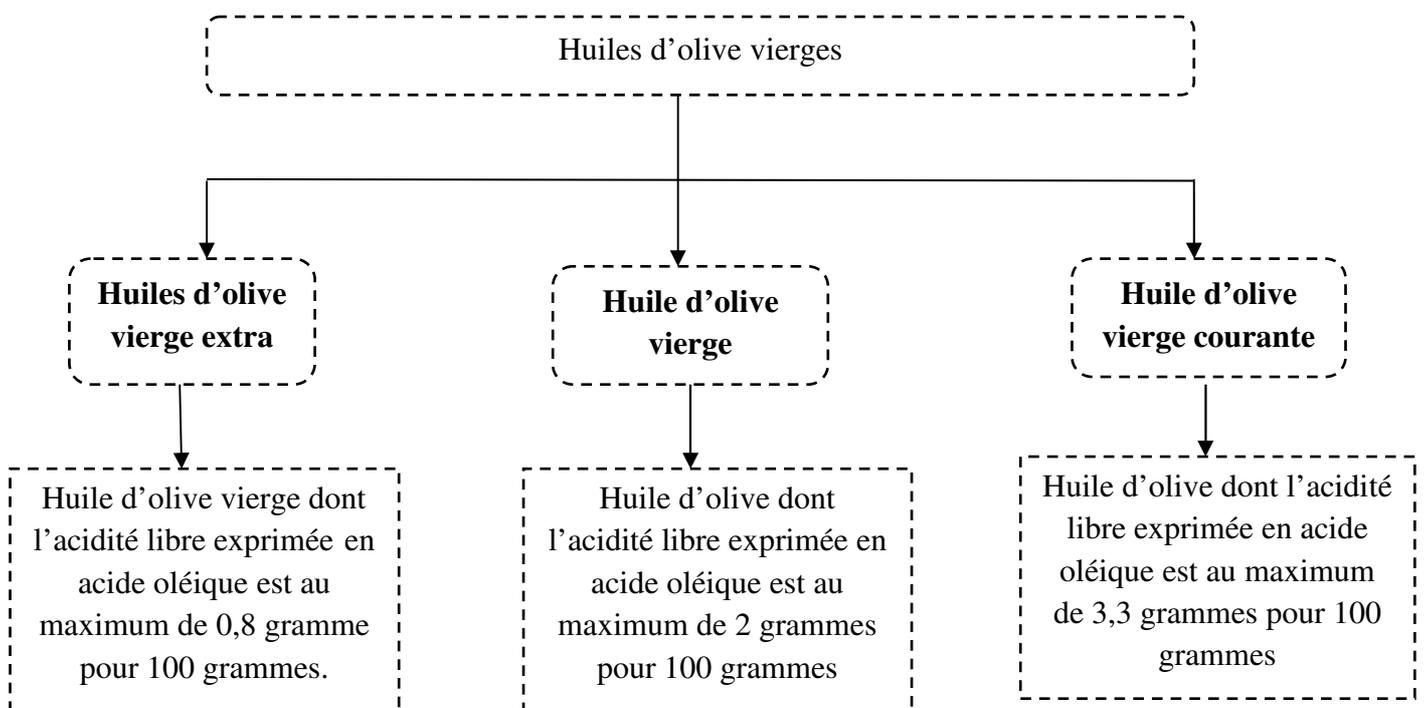
### I.3. Les huiles d'olive

#### I.3.1. Différents types des huiles d'olives

Le COI [23] a clairement défini les différents types d'huile d'olive (vierge, raffinée, grignon). Le classement des huiles d'olives est le suivant :

**A. Les huiles d'olive vierges :** huiles obtenues à partir du fruit de l'olivier, uniquement par des procédés mécaniques ou d'autres procédés physiques dans des conditions thermiques notamment, qui n'entraînent pas l'altération de l'huile, et n'ayant subi aucun traitement autre que le lavage, la décantation, la centrifugation et la filtration.

L'organigramme ci-après illustre les types d'huile d'olive vierges.

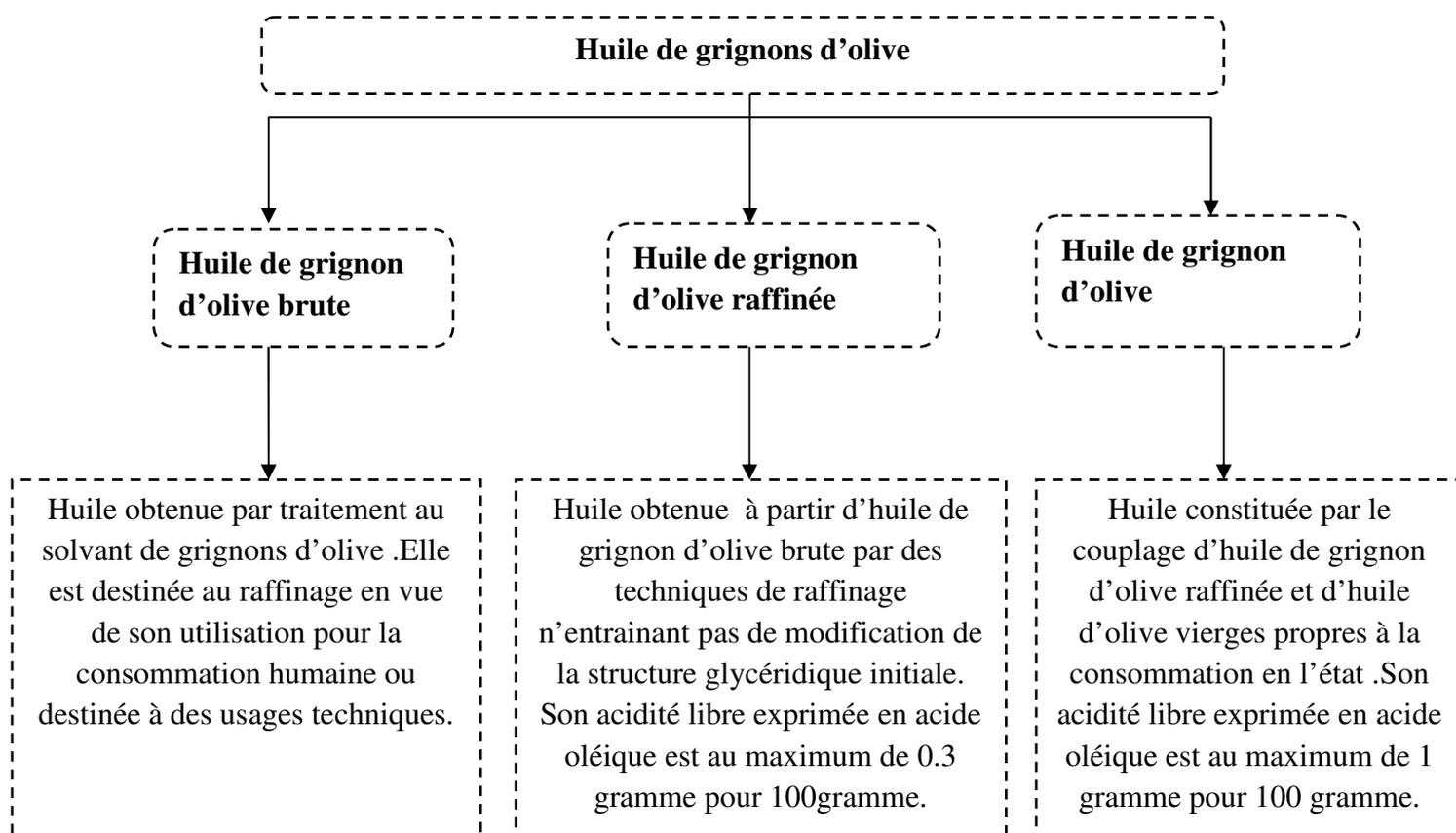


**B. Huile d'olive vierge non propre à la consommation :** L'huile d'olive vierge lampante est l'huile d'olive dont l'acidité libre exprimée en acide oléique est supérieure à 3.3 gramme pour 100grammes.

**i. L'huile d'olive raffinée :** huile d'olive obtenue des huiles d'olive vierges par des techniques de raffinage qui n'entraînent pas la modification de la structure glycéridique initiale. Son acidité libre exprimée en acide oléique est au maximum de 0.3 gramme pour 100gramme.

**ii. Huile d'olive :** C'est une huile constituée par un coupage d'huile d'olive raffinée et d'huile d'olive vierge propre à la consommation en l'état. Son acidité libre exprimée en acide oléique est au maximum de 1 gramme pour 100 grammes.

**C. Huile de grignons d'olive :** C'est une huile d'olive obtenue par traitement aux solvants ou d'autres procédés physiques, des grignons d'olive, à l'exclusion de l'huile obtenue par des procédés de réestérification et de tout mélange avec des huiles d'autres natures. Elle est commercialisée selon les dénominations résumées sur l'organigramme ci-après



### I.3.2.Composition chimique des huiles d'olive

#### a. Les acides gras

Les acides gras appartiennent à la famille des lipides, ce sont des molécules organiques comprenant une chaîne carbonée terminée par un groupement carboxyle [70].

Le principal acide gras de l'huile d'olive est l'acide oléique (55%-83%). Les deux autres acides importants sont l'acide palmitique (7.5%-20%) et l'acide linoléique (3.5 à 21%) [5]. L'huile d'olive est pauvre en acides gras saturés comparativement à certaines graisses alimentaires. Les limites de composition en acide gras sont mentionnées sur le tableau I.2 [26].

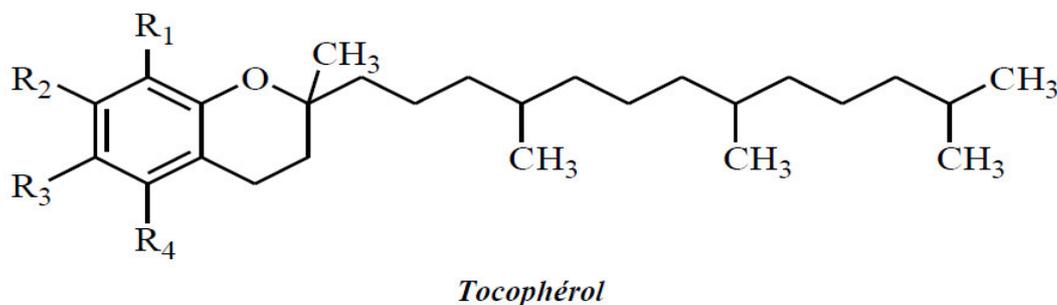
**Tableau I.2 :** Teneurs en acides gras en pourcentage par rapport aux acides gras totaux [26].

Acides gras	Pourcentages
Acide myristique	≤0.05
Acide palmitique	7.5-20.0
Acide palitoléique	0.3-3.5
Acide heptadécanoïque	≤0.3
Acide heptadécénoïque	≤0.3
Acide stéarique	0.5-5.0
<b>Acide oléique</b>	<b>55.0-83.0</b>
Acide linoléique	3.5-21.0
Acide linoléinique	1.0
Acide arachidique	≤0.6
Acide eicosénoïque	≤0.4
Acide béhénique (1)	≤0.3
Acide lignocérique	≤0.1
(1) ≤0.2 pour les huiles du grignon d'olive	

### b. Tocophérols

Les tocophérols désignent l'ensemble des molécules composées d'un noyau 2-méthyle-6-chromanol et d'une chaîne latérale de 16 atomes de carbone saturée en C<sub>2</sub> [80].

L'huile d'olive contient des tocophérols  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ . Le  $\alpha$ -tocophérol est majoritaire à plus de 88% avec une teneur moyenne d'environ 12 à 25 mg/100g [67].

**Figure I.4 :** Structure générale d'un tocophérol [16].

**Tableau I.3:** Structures des tocophérols [16].

Structure	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Alfa-tocophérol	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	CH <sub>3</sub>
Béta-tocophérol	CH <sub>3</sub>	H	OH	CH <sub>3</sub>
Gama-tocophérol	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	H
Delta-tocophérol	CH <sub>3</sub>	H	OH	H

### c. Les composés phénoliques

L'huile l'olive contient des composés phénoliques simples et complexes qui augmentent sa stabilité et lui confèrent des propriétés antioxydants et modulent sa saveur [33].

La teneur en composés phénoliques de l'huile d'olive est fonction de la variété des olives, de leur maturité au moment de la récolte, de l'environnement et des conditions de traitement [10].

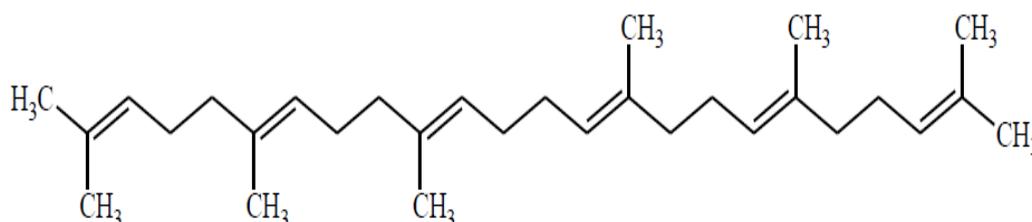
### d. Les composés aromatiques

Les composés aromatiques sont des molécules de faible poids moléculaire (inférieur à 300 Dalton) possédant une volatilité à température ambiante [7]. On estime que plus de 70 composés contribuent au parfum et au goût particulier de l'huile d'olive [75].

### e. Les hydrocarbures

Le squalène est le principal hydrocarbure de l'huile d'olive, c'est un triterpène qui apparaît dans la voie de la biosynthèse du cholestérol. Sa présence dans l'huile d'olive est d'environ 400-450mg/100g [63].

Outre le squalène, l'huile d'olive contient aussi d'autres hydrocarbures, mais en très faibles quantités tels que le  $\beta$ -carotène (provitamine A): 0,03-0,36mg/100g [47].

**Figure I.5 :** Structure générale d'un squalène [69].

### **f. Les Pigments**

La coloration de l'huile d'olive vierge est due essentiellement à la présence de pigments colorants appartenant à la famille des caroténoïdes et chlorophylle [11].

La composition et la teneur totale des pigments naturellement présents dans l'huile, sont des paramètres importants parce qu'elles sont corrélées à la couleur, qui est un attribut de base pour évaluer la qualité de l'huile d'olive.

Les pigments sont également impliqués dans les mécanismes de l'auto-oxydation et de la photo-oxydation. Leur contenu dans l'huile d'olive s'étend entre 1 et 20 ppm [12].

### **g. Les stérols**

Les stérols sont des alcools supérieurs monovalents ; les principaux stérols dans l'huile sont : le Beta-sitostérol, le stigmastérol et le campestérol [4].

## **I.3.3.Méthode d'extraction des huiles d'olive**

L'extraction de l'huile d'olive a toujours été le principal objectif de la culture de l'olivier. Les méthodes d'extraction ont évolué mais le processus d'extraction d'huile d'olive reste toujours le même. Il inclut : le triage, le broyage, le malaxage et la séparation des phases liquides [26].

### **1) Triage des olives**

Le premier stade du cycle de production de l'huile consiste à trier les olives pour les séparer des corps étrangers (brindilles, terre, cailloux, feuilles.....). Selon les ressources des producteurs et le type de culture, ce travail de tri se fera à la main, à l'aide de tamis ou des machines adaptées.

Après triage, il convient de procéder à l'opération des olives à l'aide d'un courant d'eau recyclable. Le nettoyage des olives vise principalement l'élimination de toutes les impuretés pouvant avoir des incidences négatives sur les qualités organoleptiques (couleur, odeur, goût) de l'huile et sur le matériel d'extraction [26].

### **2) Broyage**

Le broyage occupe une importance primordiale dans le processus d'extraction de l'huile. Il consiste à soumettre les olives à l'action des meules de pierre ou de broyeurs afin d'opérer la rupture des parois des tissus refermant la matière huileuse [7].



**Figure I.6 :** Broyeurs à marteaux.

### 3) Malaxage

Le malaxage est indispensable et s'opère dans des bacs semi-cylindriques avec pales tournant lentement, il assure à la pâte l'onctuosité nécessaire à une bonne répartition sous les presses et à un pressurage homogène et régulier. En fin de malaxage, la pâte doit être homogène, sans aucun morceau de pulpe. La majeure partie des noyaux est brisée [7].



**Figure I.7 :** Bacs de malaxage (a) unique,

(b) trois bacs en série.

Le broyage et le malaxage conduisent à la formation d'une pâte qui contient de la matière solide et des fluides.

La matière solide appelée grignon est formée de noyaux, d'épiderme, de parois cellulaires .....etc., alors que la partie fluide est composée d'huile et d'eau de végétation appelée margine [26].

### 4) L'extraction d'huile:

La pression est le procédé d'extraction de l'huile le plus ancien. La pâte est répartie en couches sur des scourtins, disque en fibres naturelles ou synthétiques, faisant office

d'armature et permettant la filtration lors de la pression. Ces disques sont empilés les uns sur les autres pour être ensuite pressés [10].

La phase liquide s'écoule dans un bac. Le grignon reste sur les scourtins, alors que l'huile est séparée des margines par décantation naturelle ou centrifugation verticale [26].



**Figure I.8** : Presse hydraulique.



**Figure I.9** : centrifugeuse verticale.

### **I.3.4.Facteurs déterminant la qualité de l'huile d'olive**

Le Conseil Oléicole International vise à améliorer encore la qualité du produit qui dépend de plusieurs facteurs :

- ✓ De la qualité des olives dont elle provient et en plus, des différentes étapes qui s'étendent de la production (labour, l'âge de l'arbre, taille des oliviers, quantité d'engrais, l'irrigation, la variété) à la cueillette des olives (l'état du fruit, son degré de maturation au moment du ramassage) et de la fabrication à la conservation de l'huile [6.54. 56 .78.79].
- ✓ Le lavage des olives après la récolte: l'olive doit subir un lavage qui permet d'éliminer les levures et les microorganismes qui se trouvent sur la pellicule des drupes. Ces organismes unicellulaires peuvent passer dans l'huile et se développer, atténuant ainsi la qualité de l'huile [62]. Au bout de quelques mois de stockage l'huile devient de goût rance et dégage des odeurs désagréables. De même, l'opération d'effeuillage est nécessaire et recommandée pour améliorer la qualité des huiles produites.
- ✓ Le traitement thermique des olives affecte d'autres traits de la qualité, comme la stabilité oxydative, la composition en arômes et également un changement de la quantité des pigments de l'huile d'olive vierge [65].

- ✓ Le stockage et la conservation constituent des facteurs importants dans la qualité de l'huile destinée à la consommation. En effet, une fois l'huile obtenue, il est important de la stocker à l'abri de la lumière et dans un endroit sec à l'abri de l'air, de préférence dans des récipients en acier inoxydable ou en verre et non en matière plastique qui donne un mauvais goût à l'huile [25.48]. Des changements de température de conservation favorisent la dégradation de l'huile d'olive.

**II.1. Insaponifiable****II.1.1. Définition**

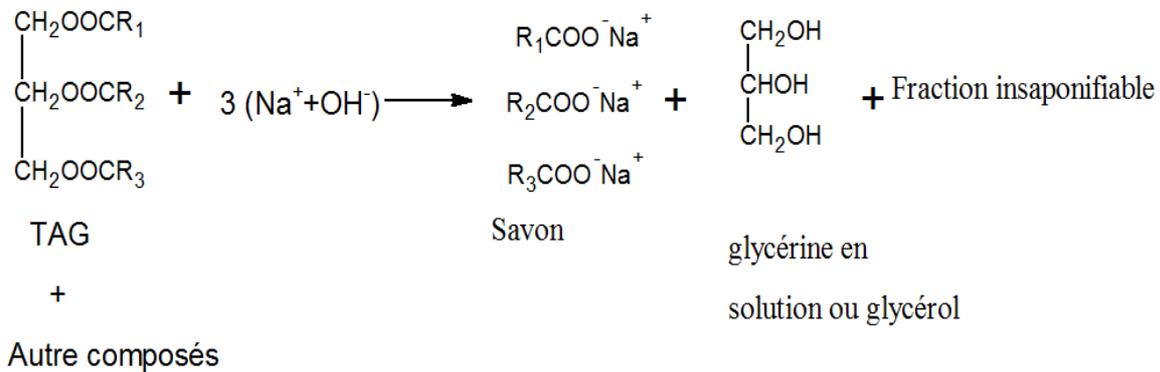
La fraction insaponifiable ou « insaponifiable » d'un corps gras donné comprend l'ensemble de ses constituants qui, après hydrolyse basique (saponification), sont très peu solubles dans l'eau et solubles dans les « solvants des graisses » tels que l'éther diéthylique, hydrocarbures aliphatiques, solvants chlorés, hydrocarbures aromatiques [55.66].

Le taux insaponifiables des huiles végétales est relativement faible (de 0,2 à 2,0 % m/m) [45.77]. À l'exception du beurre de karité qui présente une teneur en insaponifiable d'environ 10 % [45]. Tableau II.1.

**Tableau II.1** : Teneur en insaponifiable de quelques huiles végétales.

<b>Huile</b>	<b>Teneur en insaponifiable (% m/m)</b>
Tournesol	0,5 - 1,5
Colza	0,7 - 1,8
Soja	0,5 - 1,6
Maïs	0,8 - 2,0
Pépins de raisin	0,8 - 1,5
Carthame	1,0 - 1,5
Sésame	0,5 - 1,5
Oeillette	0,5 - 1,3
Lin	0,3 - 1,2
Amande	0,3 - 1,2
Noisette	0,5 - 0,7
Noix	0,5 - 1,0
Pépin de cassis	1,0 - 1,2
Citrouille	1,2
Courge	2,1
Melon	1,0
Germe de blé	3,0 - 4,0
Arachide Afrique	0,6 - 1 0
Arachide Amérique du sud	0,6 - 0,9
Coton	0,6 - 1,5
Coprah	0,6 - 1,5
Palmiste	0,3 - 0,8
Beurre de cacao	0,3- 0,5
Karité	7,0 - 10,0
Olive vierge	0,4 - 0,8
Palme	0,5 - 1,2
Avocat	1 - 12,0

Ona la réaction chimique suivant :



**Figure II.1:** Réaction d'hydrolyse alcaline (saponification) des corps gras [3].

### II.1.2. Composition chimique d'insaponifiable

Selon **Merrien et al (1992)**, les constituants chimiques de la fraction insaponifiable peuvent être extrêmement variés en nature et en proportions :

- Des hydrocarbures divers: hydrocarbures aliphatiques saturés et insaturés, hydrocarbures triterpéniques (squalène) ou tétraterpéniques (carotènes) etc.
- Des composés terpéniques: alcools triterpéniques penta et tétracycliques, ainsi que des 4-méthylstérols et des stérols, produits d'évolution du cycloarténol et du lanostérol. Outre les carotènes, on rencontre des tétraterpènes comportant des fonctions oxygénées (alcools, époxydes, cétones,...) connus sous le nom de xanthophylles.
- Des alcools gras: les cires sont des esters d'acides et d'alcool gras.
- Des vitamines liposolubles: les vitamines A, D, E peuvent être rencontrées dans les corps gras ; en particulier, la vitamine E (tocophérols et tocotriénols) est observée de façon systématique, avant saponification, ils sont présents à la fois sous forme libre et sous forme d'esters d'acides gras.

## II.2. Les phytostérols

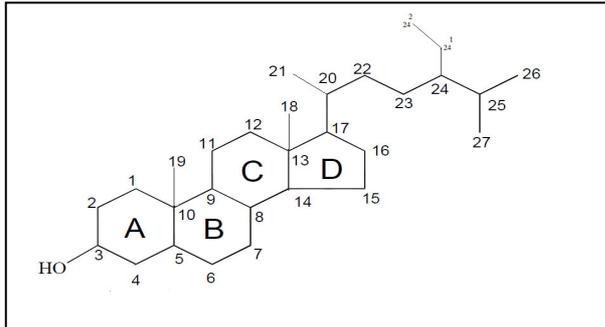
### II. 2.1 .Définition

Les stérols des plantes, appelés phytostérols, sont des alcools stéroïdes, membres de la famille des terpènes. Les phytostérols sont constitués d'un assemblage tétracyclique cyclopentaphénanthrénique (A, B, C, D) comprenant un groupement hydroxyle en position 3 du cycle A et une chaîne latérale. Les phytostérols ont une structure chimique similaire au

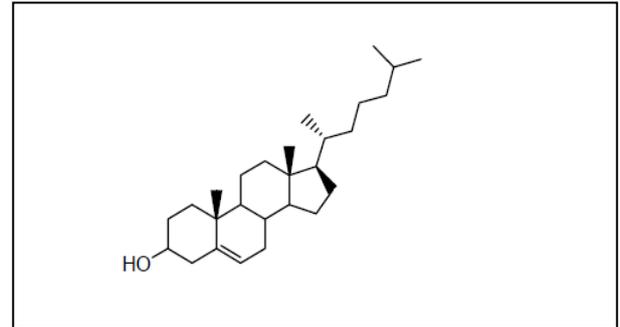
cholestérol [28.80]. Les stanols végétaux sont des stérols saturés (sans doubles liaisons dans la structure chimique) et sont moins abondants dans la nature que les stérols [59].

La quantité totale de stérols dans l'huile d'olive extra vierge varie de 113 à 265mg/100g. Dans l'huile d'olive, le principal stérol est le  $\beta$ -sitostérol, représentant jusqu'à 90-95% du total, et qui a une action anticarcinogène. Le campestérol et le stigmastérol comptent respectivement pour 3% et 1% du total [39.47].

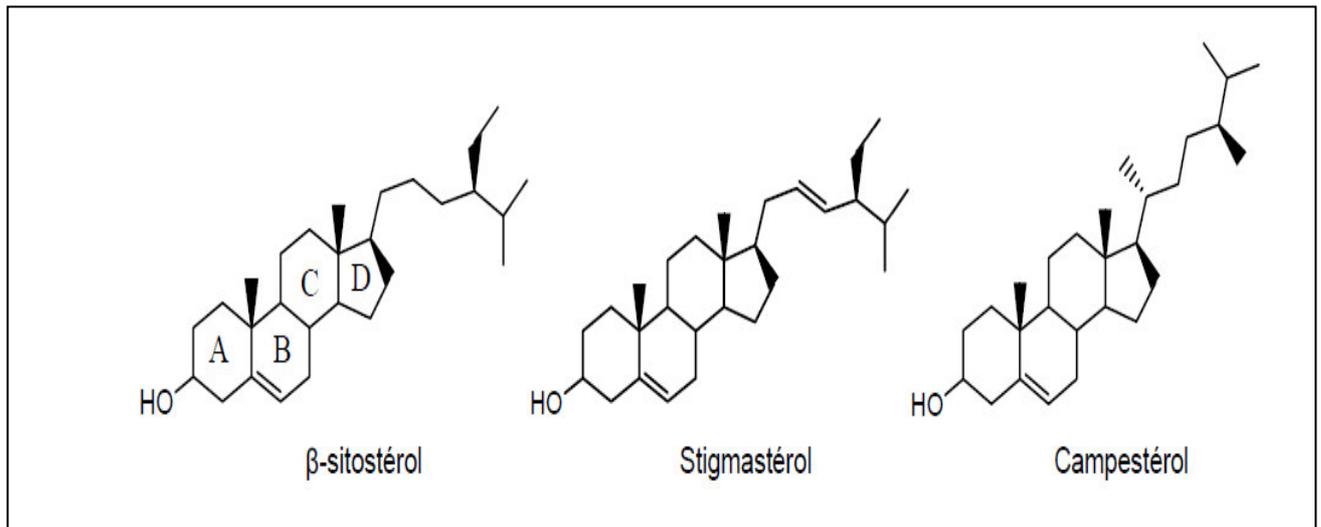
### II.2.2. Structure



Phytostérol



Cholestérol



**Figure II.2** : Structure chimique du cholestérol et des principaux phytostérols [28.80].

### II.2.3. Les effets des Phytostérols

Les effets des phytostérols sur la santé font l'objet de nombreux travaux depuis quelques années.

C'est en raison de leur pouvoir hypocholestérolémiant que les stérols d'origine végétale ont suscité le plus d'intérêt. Par leurs propriétés amphiphiles, ils inhibent l'absorption intestinale du cholestérol en le remplaçant dans les micelles de sels biliaires [17.41.61.73.74.76].

Il a été également suggéré que les phytostérols inhibent la biosynthèse du cholestérol et que le  $\beta$ -sitostérol en particulier interfère avec l'absorption du cholestérol micellaire [34].

En 2000, la (FDA) a reconnu officiellement que les produits contenant des phytostérols diminuaient les risques des maladies cardiovasculaires s'ils étaient associés à une alimentation pauvre en graisses saturées et en cholestérol [32].

Les phytostérols sont aussi étudiés pour leur action anticancéreuse [8.14.74].

Immunomodulatrice [82]. Et anti inflammatoire [13]. Cependant, l'autorité Européenne de sécurité des aliments (EFSA) a fixé une dose maximale journalière à 3g de stérols et/ou stanols [30]. Suite à des travaux montrant qu'une surconsommation de phytostérols entraînait une diminution de la teneur en  $\alpha$ - et  $\beta$ -carotène dans le sang [51].

**Tableau II.2 :** Teneur en phytostérols de divers aliments [29].

Aliment	Teneur en phytostérols g/kg
Huile de maïs	7,15 – 9,52
Huile de canola	6,46 – 8,08
Huile de tournesol	3,10
Huile de soja	3,00
Huile d'olive (extra vierge)	1,44 – 1,50
Blé	0,60 – 0,69
Avoine	0,33 – 0,52
Maïs	0,178
Pomme de terre	0,04
Pomme	0,13
Orange	0,24

### III.1. Définition de la margarine

La margarine est une émulsion de type eau dans l'huile W/O qui comprend deux phases essentielles :

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

Elle contient aussi des additifs :

- Liposolubles (solubles ou dispersés dans le corps gras) tels que : la lécithine, les mono et Diglycérides (comme émulsifiants), les colorants, les arômes naturels ou synthétiques, et les vitamines.
- Hydrosolubles (solubles ou dispersés dans l'eau) tels que : le sel, le sucre, les conservateurs.

La margarine est un système polydispersé de corps gras à l'état solide et à l'état liquide, d'eau et /ou de lait et des ingrédients et quelquefois des bulles de gaz [45].

### III.2. Définition d'une émulsion

Le terme émulsion définit un système constitué d'un liquide dispersé sous forme de fines gouttelettes dans un autre liquide. Le caractère essentiel d'une émulsion est la non-miscibilité des constituants en présence [37].

Une émulsion comprend deux liquides non-miscibles (en principe de l'huile et de l'eau) dont l'un est dispersé sous forme de fine gouttelettes dans l'autre [9].

### III.3. Les différents types de margarine

Les margarines ont des teneurs en lipides différentes et c'est la proportion de ces derniers qui va différencier une margarine d'une autre [50].

#### A. Margarine de table

Elles sont destinées aux emplois ménagers et culinaires, dont :

##### ➤ Margarine de table tartinable

Elle présente un apport élevé en acides gras polyinsaturés principalement linoléique de 20 à 30%, 25 à 40 % d'acides mono-insaturés, 10 à 30% d'acides gras saturés, 15 à 30% d'acides trans. Le rapport polyinsaturés/saturé est de 0.3 à 0.7 [27].

➤ **Margarine de table végétale**

Elles contiennent de 6 à 12% d'acide gras polyinsaturés, 25 à 55% d'acides mono-insaturés, 10 à 30 % d'acides gras à chaînes courtes et moyennes, 35 à 75 % d'acides saturés et jusqu'à 51 % d'acides trans. Le rapport polyinsaturés/saturés varie de 0.1 à 0.03% [27].

**B. Margarine diététiques**

Elles possèdent une forte teneur en acides gras essentiels et sont parfois enrichies en vitamine A et E.

Les margarines diététiques sont destinées pour certains emplois particuliers comme: les sportifs, les régimes amaigrissants, les enfants et vieillards, certaines catégories de malades.

➤ **Margarine enrichies en phytostérols**

« Fruit d'or » était premier producteur de sa margarine "santé". C'est la fameuse Pro.Active : 20g par jour (environ 4 tartines) permettraient de réduire de 15 à 20% le taux de mauvais cholestérol (correspondant à une réduction de plus de 40% des risques cardiovasculaires). Ceci sans modifier le taux de bon cholestérol.

La qualité de cette margarine a été démontrée par de nombreuses études scientifiques. [36.38.40.58.60.71.81].

**III.4. Fabrication de la margarine**

La fabrication de la margarine est une technologie connue et maîtrisée (figure III.1). Elle comprend succinctement les phases suivantes :

- ✓ Préparation de la phase grasse complète: huiles et graisses telles qu'elles sont raffinées et/ou modifiées par hydrogénation, interstérification ou fractionnement plus les additifs liposolubles (émulsifiant, colorant, vitamine)
- ✓ Préparation de la phase aqueuse complète: eau et/ou lait plus les additifs hydrosolubles (sel, arômes, antioxydants, conservateurs, correcteurs de pH)
- ✓ Préparation de l'émulsion ; mélange des deux phases précédentes.
- ✓ Refroidissement, cristallisation, malaxage de l'émulsion de manière à lui conférer les caractéristiques rhéologiques espérées et la stabilité désirée.
- ✓ Conditionnement du produit sous enveloppage (margarines traditionnelles) ou en Pots confectionnés en différents matériaux [5].

### III.4.1. Préparation de la phase grasse

La phase grasse est un mélange des huiles et graisses telle quelle, raffinées et/ou modifiées par hydrogénation, inter estérification ou fractionnement, on ajoute à ce mélange des additifs liposolubles tel que la lécithine, monoglycérides, colorants dans des proportions bien définies, on obtient donc la phase grasse complète [45].

#### 1. Additifs liposolubles

Ce sont des émulsifiants, colorants, vitamines et arômes.

##### ➤ Les émulsifiants

Ce sont des composés ayant des propriétés tensioactives, dues à leur caractère amphiphile, leur structure chimique se compose à la fois de groupes hydrophiles et lipophiles et de ce fait pouvant se dissoudre dans les deux phases permettant leur union sous forme d'émulsion homogène. Ces corps sont caractérisés par leur équilibre hydrophile-lipophile ou HLB. Les émulsifiants utilisés dans les margarines sont les mono et diglycérides et la lécithine [36.45].

##### ➤ Les agents colorants

La couleur de la margarine doit être assez voisine de celle du beurre. Elle est obtenue soit par addition d'huile de palm rouge riche en caroténoïdes. Soit de  $\beta$ -carotène de synthèse [53].

##### ➤ Les arômes

Les margarines sont souvent aromatisées par le diacétyle arôme naturel du beurre ou le butane Dione 1.3. On utilise une solution dans l'huile à 4%. Au-delà d'une certaine limite, le goût n'est pas agréable et jugé comme artificiel [45].

##### ➤ Les vitamines liposolubles

Afin de réduire les risques de carences en vitamines A du fait du remplacement du beurre par la margarine, certains pays Européens avaient depuis longtemps invités les fabricants de margarine à introduire 20 à 30 UI de vitamine A dans leurs produits [45].

### III.4.2. Préparation de la phase aqueuse

La préparation de la phase aqueuse consiste à mettre en solution de l'eau pasteurisée et/ou du lait mûré, additionné d'additifs hydrosolubles tel que: sel, sucre, correcteurs de pH, conservateurs [44].

➤ **L'eau**

L'eau utilisée doit répondre aux critères de potabilité, elle doit subir un adoucissement pour éliminer les ions métalliques catalyseurs d'oxydation et les substances toxiques et une pasteurisation pour éliminer les microorganismes [45].

**1. Les additifs hydrosolubles**

➤ **Le sel**

Il est premier lieu ajouté pour améliorer la sapidité, mais il peut jouer un rôle protecteur « Bactériostatique ». Les teneurs peuvent varier de 0.1 à 1 et même 2%. Le sel utilisé doit être de qualité alimentaire, pratiquement anhydre, neutre ou faiblement alcaline avec absence de sels de Mg, de Fe et d'ions  $SO_2$  qui accélèrent l'oxydation des graisses. En solution dans l'eau il doit donner une saumure limpide et claire [27].

➤ **Les conservateurs**

Outre le sel de table (NaCl), l'addition de l'acide sorbique (E200) ainsi que ses sels de sodium (E201), de potassium (E202) et de calcium(E203) isolément ou ensemble dans une proportion pondérale de 2g par kilogramme de produit fini, emploi autorisé si le pH de la phase aqueuse est inférieur à 5.5. L'acide sorbique est un acide faible, avec ses sels, il présente un bon effet fongicide dont l'action inhibitrice est fonction de la concentration en acide non dissous, elle augmente quand le pH diminue [45].

➤ **Les correcteurs de pH**

L'acide citrique, lactique et leurs sels de Na, K et Ca, sont autorisés.

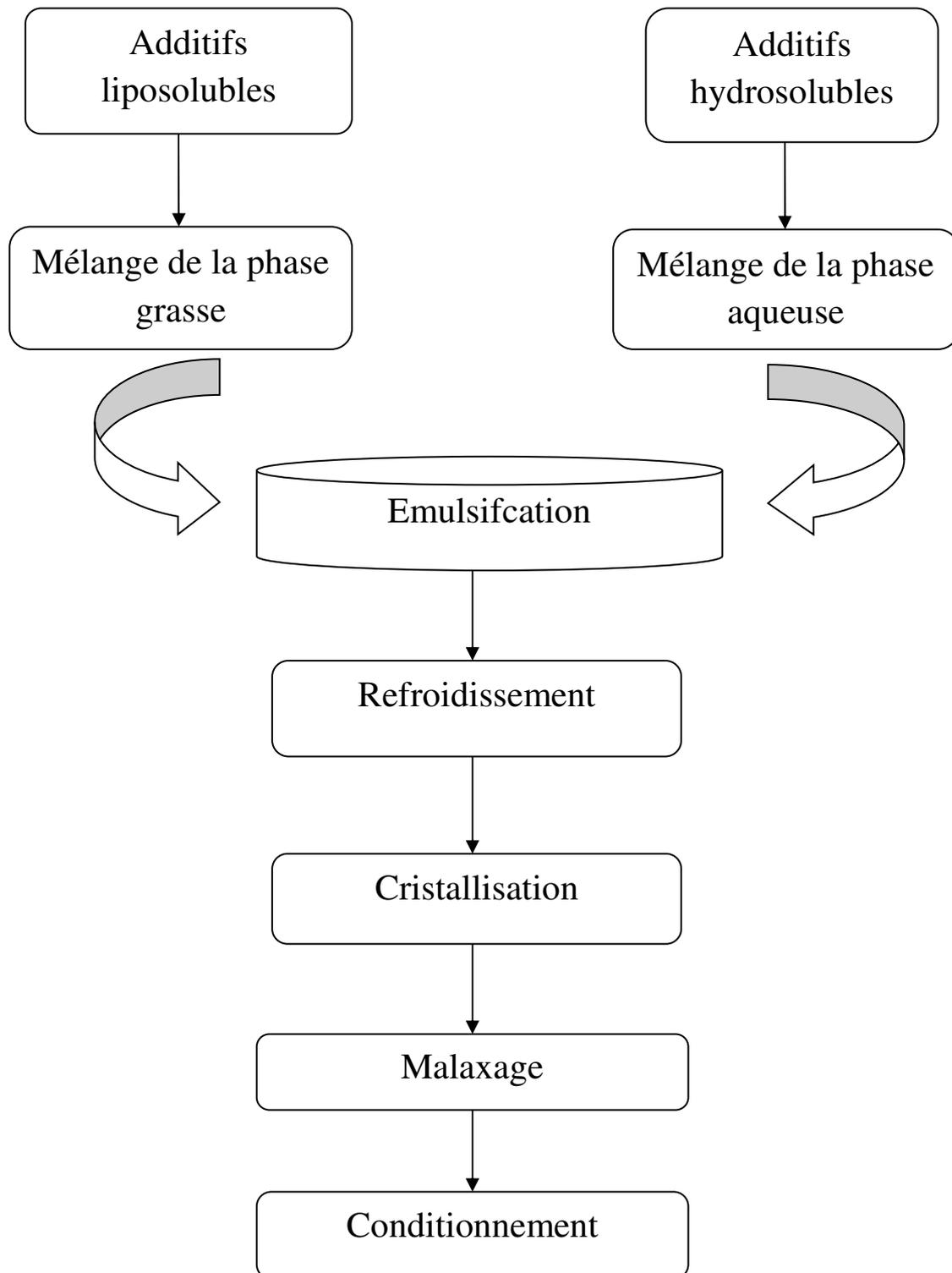
L'acide citrique est autorisé à la maximale de 1g par Kg de produit fini. Au niveau des corps gras, c'est un antioxydant synergiste puissant. En général on fixe le pH entre 4 et 5.5 [31].

➤ **Les antioxygènes**

On peut ajouter des tocophérols (extraits naturels) via la phase, qui ont pour rôle d'éviter l'oxydation des huiles en retardant l'apparition du rancissement [45].

➤ **Les révélateurs**

L'amidon introduit tant que révélateur à une dose de 0,2% permet de différencier la margarine du beurre, quoi qu'il existe actuellement d'autres moyens de les distinguer [45].



**Figure III.1:** Diagramme de fabrication de la margarine [45].

Dans ce chapitre, on décrit le matériel utilisé et les méthodes suivies lors des procédés expérimentaux.

#### IV. 1. Matériels

##### IV.1.1. Matériel végétal

Le matériel utilisé au cours de notre étude consiste en : huile d'olive vierge de variétés de Limli. Cette huile est caractérisée avec des fruits petits, sous forme ovoïde.

##### IV.1.2. Matériels de laboratoire

Le matériel de laboratoire utilisé lors des expériences consiste en l'appareillage, matériels consommables de laboratoire, ainsi que les réactifs. L'ensemble sont cités en annexes.

#### IV.2. Méthodes opératoires

Cette étude a été répartie en différentes étapes, à savoir :

- Caractérisation physico-chimique de l'huile d'olive.
- Extraction des phytostérols de l'huile d'olive.
- Formulation de la margarine diététique moyennant le plan d'expérience.
- Caractérisation physico-chimique et microbiologique de la margarine.

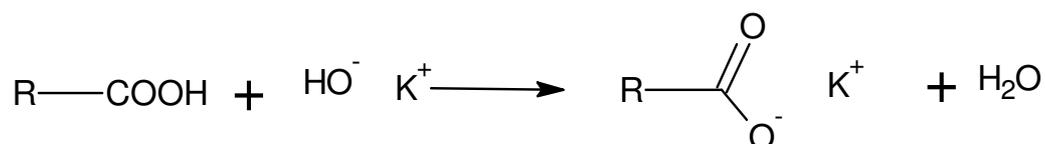
##### IV.2.1. Caractérisation physico-chimique de l'huile d'olive

Les tests de détermination des caractéristiques physico-chimiques de l'huile d'olive (acidité, Indice d'acide, indice de saponification, indice de réfraction, indice de peroxyde) ont été réalisés au niveau du laboratoire de chimie organique au département de chimie industrielle, Université de Blida.

###### a. Acidité libre

Elle correspond à la teneur en acides gras (exprimée en acide oléique) présent dans l'huile d'olive et représente un paramètre important dans l'évaluation de sa qualité. Elle est mesurée selon la norme AFNOR (1984).

Le principe repose sur la neutralisation des acides gras à l'aide d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium de normalité 0,5mole/L selon la réaction suivante :



❖ Mode opératoire :

L'analyse a été effectuée sur l'échantillon filtré. 6g d'huile d'olive a été dissoute dans 100ml du mélange éthanol/toluène (V/V), puis titré, en agitant, avec la solution d'hydroxyde de potassium (KOH) à 0,1N en présence de 0,3ml de la solution de phénophtaléine à 1% dans l'éthanol, jusqu'au virage de l'indicateur (coloration rose).

L'acidité, exprimée en pourcentage est égale à :

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

Où :

V : le volume en ml de la solution titrée de KOH utilisé.

C : la concentration exacte, en moles /litre, de la solution titrée de KOH utilisé.

M : le poids molaire, en g/mole, de l'acide oléique (282g/mol).

m : la prise d'essai en grammes.

**b. Indice d'acide**

C'est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser les acides gras libres présents dans 1g de corps gras. Le même principe et mode opératoire que ceux décrits précédemment ont été utilisés. L'indice d'acide est donné par la formule

$$\text{L'indice d'acide} = 56.1 * V * C / m$$

Où :

V, C et m ont les mêmes significations que l'équation d'expression de l'acidité.

56.1: est la masse molaire exprimée en g/mole de l'hydroxyde de potassium(KOH).

**c. Indice de saponification**

La détermination de l'indice de saponification est réalisée en utilisant la méthode (ISO 3657-1988).

L'indice de saponification est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire pour saponifier un gramme d'huile.

❖ Mode opératoire :

- Peser dans un ballon 2 g d'huile d'olive.
- Ajouter 25ml de solution éthanolique d'hydroxyde de potassium (0.5N).
- Adopter au réfrigérant le ballon contenant la pris d'essai et la solution éthanolique d'hydroxyde de potassium.
- Placer le ballon sur dispositif de chauffage et faire bouillir doucement au moins 60 minutes à  $T=80^{\circ}\text{C}$ , en agitant de temps en temps.
- Après refroidissement, ajouter 4 à 5 gouttes de phénophtaléine.
- Titrer la solution savonneuse avec la solution d'acide chlorhydrique à 0.5N.
- Effectuer simultanément un essai à blanc.

L'indice de saponification est calculé par la relation suivante :

$$\text{Indice de saponification} = (V_0 - V_1) * T * 56.1 / M$$

Où :

$V_0$  : le volume en ml de la solution d'acide chlorhydrique, utilisé pour l'essai à blanc.

$V_1$  : le volume en ml de la solution d'acide chlorhydrique.

$M$  : la masse en grammes de la prise d'essai.

$T$  : le titre de la solution de l'acide chlorhydrique utilisée (0.1mol/l).

**d. Indice de réfraction** (Selon la méthode ISO 6320-1995)

L'indice de réfraction est le rapport de vitesse de la lumière à une longueur d'onde définie dans le vide et sa vitesse dans l'huile.

❖ Principe

Mesure à l'aide d'un réfractomètre convenable de l'indice de réfraction de l'huile d'olive à une température constante de  $20^{\circ}\text{C}$ .

❖ Mode opératoire

- Mesurer l'indice de réfraction à la température de  $+20^{\circ}\text{C}$  à laquelle, l'huile d'olive est complètement liquide.
- Maintenir la température du prisme du réfractomètre à la valeur constante requise au moyen d'une circulation d'eau assurée par le bain marie.

- Lire l'indice de réfraction à 0.0001 près en valeur absolue et noter la température du prisme de l'appareil.
- Après chaque mesure, nettoyer la surface du prisme avec un chiffon lisse, puis avec l'hexane.
- Effectuer 2 déterminations sur le même échantillon.

❖ Expression des résultats

L'indice de réfraction  $N_D^t$  à la température de référence est égale à :

$$N_D^t = N_D^{t_1} + (t_1 - t) F$$

Où :

$t_1$  : la température de mesure, en degrés Celsius.

$t$  : la température de référence, en degrés Celsius, évaluée à 20°C pour l'huile d'olive et qui fait partie des corps gras complètement liquides à cette température.

$F$  : est un facteur de correction égal à 0.00035 pour  $t=20^\circ\text{C}$ .

**e. Indice de peroxyde**

L'indice de peroxyde a été déterminé suivant la norme NF60-220.

L'indice de peroxyde d'un corps gras est le nombre de milliéquivalents d'oxygène contenus dans un kilogramme de produit et d'oxydant d'iodure de potassium avec libération d'iode.

❖ Principe

Le principe consiste à traiter une prise d'essai dissoute dans une solution d'acide acétique et de chloroforme avec une solution d'iodure de potassium. L'iode libéré est par la suite titré par une solution de thiosulfate de sodium en présence d'empois d'amidon comme indicateur.

L'indice de peroxyde est donné par la formule suivante :

$$IP = (V_2 - V_1) * N * 100 / m$$

Où :

$V_1$  : Volume de la solution de thiosulfate de sodium utilisé pour l'essai à blanc en ml.

$V_2$  : Volume de la solution de thiosulfate de sodium utilisé en ml.

$N$  : Normalité de la solution de thiosulfate de sodium (0.01N).

$m$  : masse de la prise d'essai en gramme.

❖ Mode opératoire

Dans un flacon de 250 ml, on introduit 2g d'huile d'olive que l'on dissout dans 10ml de chloroforme et 15ml d'acide acétique. On ajoute 1ml de la solution d'iodure de potassium, on bouche aussitôt le flacon. On agite pendant une minute et on laisse pendant 5 minutes à l'abri de la lumière puis on ajoute 75ml d'eau distillée.

Enfin, Titrer en agitant vigoureusement et en présence d'empois d'amidon comme indicateur jusqu'à disparition de la couleur. L'iode libéré avec la solution de thiosulfate de sodium 0.01N.

Effectuer sans le corps gras un essai à blanc.

#### **IV.2.2. Extraction des phytostérols**

##### **a. Préparation de l'insaponifiable**

La méthode d'extraction et de dosage adoptée pour l'insaponifiable est celle du Règlement(CEE) N°2568/91.

❖ Extraction : elle s'est déroulée selon les étapes suivantes :

Peser exactement  $20 \pm 0.1$ g d'huile dans un ballon de 250ml, ajouter 1ml de la solution étalon de cholesta-3,5-diène (cholestanol) (20 $\mu$ g) et 75 ml de potasse alcoolique à (1N), connecter au réfrigérant à reflux et chauffer jusqu'à apparition d'une légère ébullition pendant 30minutes.

Retirer le ballon contenant l'échantillon et laisser refroidir légèrement (si on laisse refroidir complètement, l'échantillon se solidifie). Ajouter 100ml d'eau, puis transférer la solution dans une ampoule à décanter à l'aide de 100ml d'hexane.

Agiter énergiquement le mélange pendant 30 secondes et laisser décanter.

Remarque : S'il y a formation d'émulsion, attendre un instant, car elles disparaissent rapidement. En cas de persistance, ajouter de petites quantités d'éthanol.

Soutirer la phase aqueuse inférieure dans une deuxième ampoule à décanter et extraite de nouveau à l'aide de 100ml d'hexane. Soutirer de nouveau la phase aqueuse inférieure et laver les extraits d'hexane (collectés dans une autre ampoule à décanter) à chaque fois avec un mélange de 100ml d'éthanol-eau (1 :1) jusqu'à neutralité du pH.

Passer la solution d'hexane à travers le sulfate de sodium anhydre (50g), laver avec 20ml d'hexane ,puis évaporer dans un évaporateur rotatif à 30°C sous pression réduite jusqu'au séchage. Les photos ci-après illustrent ces étapes :

Huile + potasse alcoolique (1N)	Echantillon +100ml d'eau+ 100ml d'hexane	Lavage de l'extrait d'hexane avec un mélange de 100ml d'éthanol-eau

Passer la solution d'hexane à travers le sulfate de sodium anhydre	Evaporation sous vide par rotavapor

**Figure IV.1:** Extraction des phytostérols.

### IV.2.3. Elaboration et caractérisation d'une margarine diététique à base d'extraits.

#### ❖ Notions théoriques sur les plans d'expériences.

Un plan d'expérience est une planification de l'ensemble des expériences d'un problème multiparamétrique. Son objectif principal est de réduire au minimum le nombre d'essais expérimentaux par rapport à une approche classique, et d'en assurer une meilleure qualité de résultats, en plus il nous permet une modélisation mathématique à l'aide d'une simple régression linéaire multiple. Pour appliquer la méthode des plans d'expérience, il faut que les deux conditions suivantes soient réalisées :

##### ➤ *Condition 1*

La valeur que prend chaque variable doit être connue sans erreur, or dans un travail d'expérimentation, on ne peut nier la présence d'erreur. Donc pour satisfaire cette condition, on doit s'assurer que l'erreur induite sur la valeur de la variable soit très petite, voire négligeable devant la variation de cette même variable lorsqu'elle change de valeur [72].

##### ➤ *Condition 2*

La réponse doit être homoscedastique. Cela signifie que l'erreur de mesure doit être la même sur tout le domaine expérimental. Pour cela il appartient à l'expérimentateur de garder les mêmes gestes, le même matériel et la même cadence lors de toute la campagne d'expérimentation [72].

#### ❖ Types de plans d'expériences :

Afin de subvenir aux besoins que peut rencontrer l'expérimentateur pour mener à bien son étude, différents types de plans d'expériences peuvent être utilisés :

- Plans factoriels complets
- Plans centrés composites
- Plans fractionnaires
- Plans de mélanges

Chaque plan possède des particularités qui lui sont propres. Nous ne traiterons ici que le plan correspondant à notre étude, il s'agit des plans de mélange.

#### ❖ Les étapes de réalisation d'un plan d'expériences :

En général, cette méthode est constituée de 3 grandes étapes:

- Etape de préformulation
- Construction du plan d'expérience et réalisation des essais.
- Interprétation des résultats.

**a. Définition des objectifs**

Le principal objectif de notre travail consiste à mettre au point une nouvelle formule de la margarine qui ne contient pas de cholestérol, élaborée à base des sous produits d'extraction ; il s'agit des phytostérols.

Il est évident que notre margarine, émulsion huile dans eau doit avant stable du point de vue rhéologique et microbiologique tout au long de la période de stockage, elle doit aussi avoir de bonnes propriétés sensorielles.

**b. Modèle et plans adoptés**

Afin d'économiser les réactifs en particulier les extraits végétaux et pour une meilleure rapidité dans les expériences, nous avons adopté la stratégie de planification des plans d'expériences.

L'objectif étudié renvoi à l'utilisation d'un modèle polynomial non linéaire. Le modèle mathématique adopté dans ce cas est celui du second degré. Il s'agit d'un modèle à trois facteurs qui sont: Huile, Emulsifiant, Eau. On ne tient compte en fait que des facteurs qui varient dans le plan de mélange. Ce modèle est représenté par la formule suivante:

$$y = a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + a_3 x_3 + a_4 x_1 x_2 + a_5 x_1 x_3 + a_6 x_2 x_3 + a_7 x_1^2 + a_8 x_2^2 + a_9 x_3^2$$

Où:

Y : est désigné comme étant la réponse.

$x_1, x_2, x_3$ : sont les teneurs respectives des quatre facteurs : Huile, Eau, Emulsifiant.

$a_0, a_1, a_2, a_3, a_4, a_5, a_6, a_7, a_8, a_9$  : représentent des coefficients constants et inconnus.

En ce qui concerne le plan adopté, le choix s'est porté sur le plan D-optimal.

**c. Construction du plan d'expériences et réalisation des essais.**

Les facteurs et les niveaux sélectionnés sont introduits dans le logiciel MODDE 6. Le but est d'éviter en fait les calculs matriciels fastidieux et compliqués. L'introduction des différents facteurs avec leurs niveaux a donné les recettes ou les formules illustrées dans le tableau ci-dessous. De ce fait, le modèle utilisé est quadratique de degré 2.

**Tableau IV.1:** plan d'expérience

Essai	Huile	Emulsifiant	Eau	phtostérols	Additives liposolubles	Additives hydrosolubles
<b>1</b>	0.60	0.005	0.33	0.025	0.02	0.02
<b>2</b>	0.54	0.015	0.38	0.25	0.02	0.02
<b>3</b>	0.60	0.015	0.32	0.25	0.02	0.02
<b>4</b>	0.55	0.005	0.38	0.025	0.02	0.02
<b>5</b>	0.60	0.0083	0.326	0.25	0.02	0.02
<b>6</b>	0.60	0.0116	0.323	0.25	0.02	0.02
<b>7</b>	0.566	0.005	0.363	0.025	0.02	0.02
<b>8</b>	0.58	0.015	0.34	0.25	0.02	0.02
<b>9</b>	0.543	0.0116	0.38	0.25	0.02	0.02
<b>10</b>	0.546	0.0083	0.38	0.025	0.02	0.02
<b>11</b>	0.572	0.01	0.352	0.25	0.02	0.02
<b>12</b>	0.5.2	0.01	0.352	0.25	0.02	0.02

#### **d. Procédure de réalisation des différentes formules de la margarine**

##### ➤ Préparation de la phase grasse

Les huiles ont introduites dans un bécher et portées à une température de 40-50°C sous agitation, lorsque l'agitateur est en marche, on ajoute l'émulsifiant, la lécithine de soja et les ingrédients liposolubles (arôme, vitamine, antioxydant). On Laisse le mélange sous agitation pendant un certain temps pour dissoudre l'émulsifiant. La dissolution est réalise à l'aide d'un agitateur magnétique.

##### ➤ Préparation de la phase aqueuse

Nous avons utilisé de l'eau pasteurisée.

Dans un bécher, on met la quantité d'eau et on additionne les ingrédients hydrosolubles (acide citrique, sorbate, sel). On dissoudre bien les ingrédients.

##### ➤ Emulsification

On mélange bien les deux phases grasse et aqueuse à une température de 40-50°C pendant 15-20mn avec une agitation. Cette dernière est réalisée au moyen d'un batteur éclectique afin d'obtenir une émulsion homogène.

➤ Refroidissement

On verse l'émulsion obtenue dans un boîte et on la conserve dans le réfrigérateur jusqu' à la solidification complète.

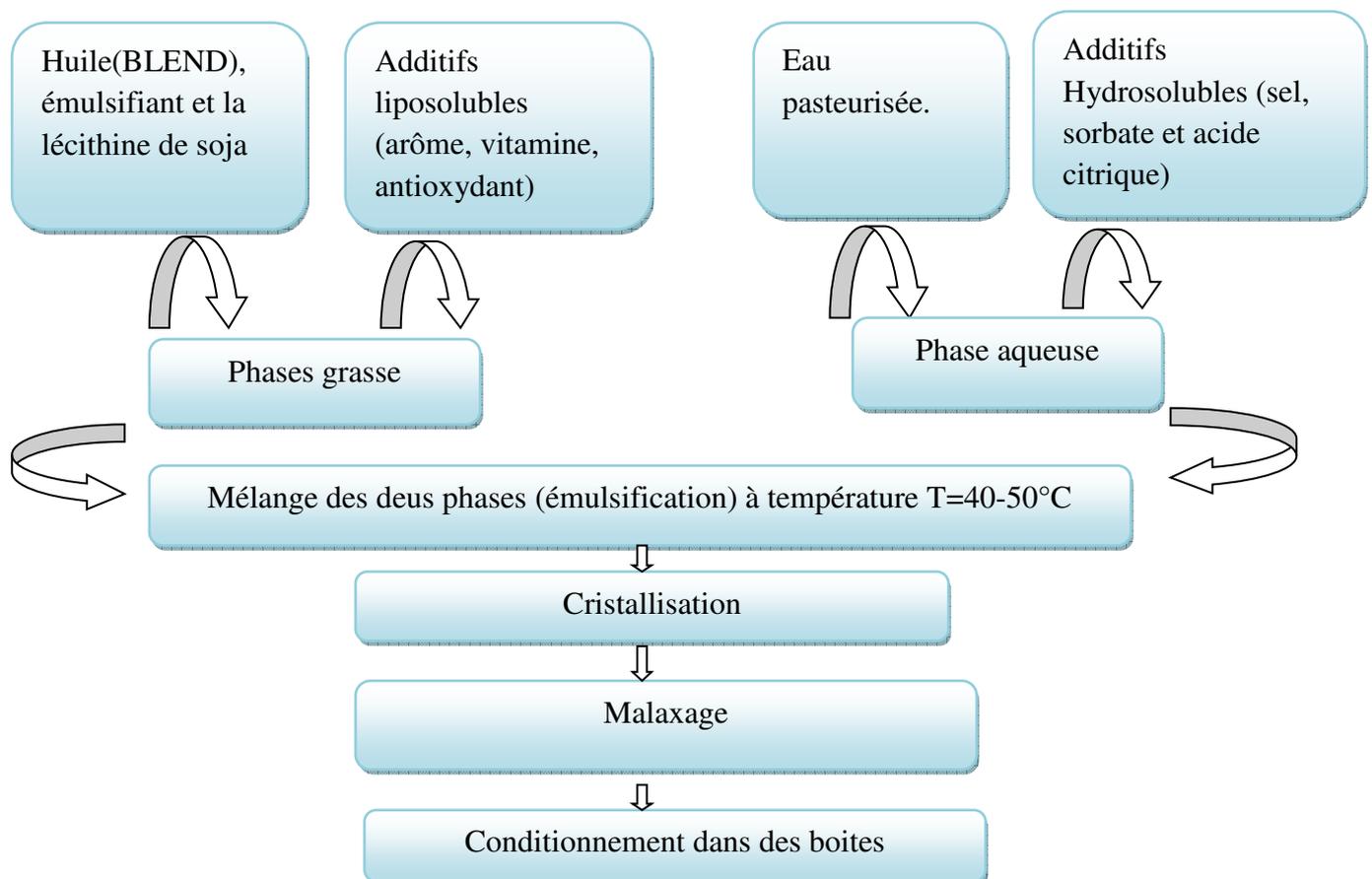
➤ Malaxage

C'est un traitement mécanique qui se fait à l'aide du batteur électrique moyennant une agitation lente, afin de conférer une plasticité et une texture convenables à la margarine.

➤ Conditionnement

La margarine allégée, une fois produite est mise dans des boîtes en plastique fermées et gardées à la température du réfrigérateur.

Les étapes de préparation (réalisés dans l'entreprise Bellat) de notre sont résumées sur le diagramme ci-après :



**Figure IV.2:** Diagramme de fabrication de la margarine diététique

### e. Caractérisation physico-chimique de la margarine

#### 1. Détermination de la teneur en eau (Wolf, 1968)

##### ❖ Principe

Le principe est basé sur la perte à l'étuve à 103°C de la margarine, mélangée avec du sable.

##### ❖ Mode opératoire

- Peser 5g de margarine dans une capsule contenant 20g de sable purifié.
- Introduire la capsule et son contenu dans une étuve réglée à 105°C pendant 30mn.
- Sortir la capsule et la laisser refroidir dans un dessiccateur puis la peser.
- Répéter l'opération (séchage, refroidissement et peser) jusqu' à obtention d'un poids constant.
- La perte à l'étuve est terminée quand la diminution de poids ne dépasse pas 0.05% par demi-heure de chauffage.

##### ❖ Expression des résultats

$$\text{Eau (\%)} = \frac{P_1}{P_2} * 100$$

Où :

P<sub>1</sub> : perte de poids (g)

P<sub>2</sub> : poids de la prise d'essai (g).

#### 2. Détermination du pH (AFNOR ,1982)

Le pH est déterminé directement sur la phase aqueuse après sa séparation de la margarine, à l'aide d'un pH-mètre. On mesure le pH chaque jour pour évaluer la stabilité du produit.

#### 3. Détermination du point de fusion (AFNOR ,1996)

##### ❖ Définition

Le point de fusion est la température à laquelle une matière grasse solidifié dans un tube capillaire se ramolait jusqu' à tel point qu'elle remonte dans le tube capillaire.

##### ❖ Principe

Il est basé sur le passage de la matière grasse de l'état solide à l'état liquide sous l'effet de la chaleur à une certaine température.

##### ❖ Mode opératoire

- On trempe deux tubes capillaires dans le fluide gras jusqu' à ce qu'ils se remplissent à une hauteur de 1cm.

- Refroidir le tube capillaire et son contenu au congélateur pendant 5mn à 8mn.
- En suite on fixe à un thermomètre de manière à ce que la partie basse des tubes soit au niveau que le fond de la boule du mercure du thermomètre à l'aide d'un élastique.
- Avant que le fluide se fige, on fait plonger le tout dans un bain à une hauteur de 3 cm au dessous de la surface.
- Le point de fusion est atteint lorsque la température est suffisante pour que la graisse monte dans les tubes.

❖ Expression des résultats

La valeur moyenne des deux tubes est considérée comme le point de fusion.

#### 4. Détermination de l'acidité (NF T 60-204/1989).

L'acidité est le pourcentage d'acides gras libres exprimés conventionnellement selon la nature du corps, en acide oléique de poids moléculaire 282.

❖ Principe :

Mise en solution d'une prise d'essai dans l'éthanol chaud, puis titrage des acides gras libres présents à l'aide d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium.

❖ Mode opératoire

Peser à 0.01g près 5 g de margarine, la dissoudre dans environ 100ml d'éthanol chaud. Titrer en agitant énergiquement, avec la solution d'hydroxyde de potassium à 0.1mol/l jusqu' au virage de l'indicateur (coloration rose de phénophtaléine persistant au moins 10s).

❖ Expression des résultats

L'acidité exprimée en pourcentage d'acide oléique est donnée par la formule suivante :

$$A = \frac{V * C * 282}{10 * m}$$

Où :

V : volume en millilitres de la solution titrée d'hydroxyde de potassium utilisée.

C : Concentration en mole par litres, de la solution titrée d'hydroxyde de potassium 0.1N.

M : Masse en gramme de la prise d'essai.

282 : Masse molaire en g/mole de l'acide oléique.

**f. Caractérisation microbiologie de la margarine :** Cette étape consiste à évaluer la stabilité microbiologique de la margarine formulée.

➤ **Préparation de la solution mère et des dilutions décimales (NF V08-010)**

Introduire aseptiquement à l'aide d'une spatule stérile, 25g de margarine dans un flacon stérile contenant au préalable 225ml de TSE. Cette suspension constitue la solution mère ( $10^{-1}$ ). Le flacon est par la suite porté au bain-marie, à 45°C. Après agitation et repos, on obtient la séparation des deux phases grasse et aqueuse. Les prélèvements s'effectuent sur la phase aqueuse à partir de laquelle des dilutions au dixième ( $10^{-2}$  et  $10^{-3}$ ) sont réalisées.

➤ **Recherche et dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux (GAMT) (NF V08-051).**

❖ Mode opératoire

A partir des dilutions décimales allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-3}$ , porter aseptiquement 1ml de chaque dilution dans une boîte de pétri préparée à cet usage. Compléter ensuite avec environ 20ml de gélose PCA en sur fusion. Faire ensuite des mouvements circulaires de va et vient en forme de « 8 », laisser solidifier puis incubé à 30°C pendant 72h.

❖ Lecture

Les colonies des GAMT se présentent sous forme lenticulaire. On dénombre les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies, le nombre trouvé sera multiplié par l'inverse de sa dilution. Le résultat final sera exprimé en germes/g de produit analysé.

➤ **Dénombrement des levures et moisissures (NF V-08 059)**

❖ Mode opératoire

On utilise le milieu OGA en boîtes de Pétriensemencées à l'aide de quatre gouttes de chaque dilution à analyser qu'on étale à la surface de la gélose, les boîtes renversées sont incubées à 20-25°C pendant 5 jours.

❖ Lecture

Les levures se présentent sous forme de colonies lisses, rondes ; les moisissures sont sous forme de colonies filamenteuses. Le résultat final sera exprimé en germes/g de produit analysé.

➤ **Recherche et dénombrement des coliformes totaux, coliformes fécaux et d'E. coli (NF V08-050).**

• **Recherche des coliformes totaux**

❖ Mode opératoire

On introduit 1ml de chaque dilution dans trois tubes de bouillon lactose bilié au vert brillant (BLBVB) réparti à raison de 10ml par tube muni d'une cloche de Durham pour déceler le dégagement éventuel de gaz dans le milieu. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 48h.

❖ Lecture

Les tubes présentant à la fois un dégagement gazeux occupant au moins 1/10 du volume éventuel de la cloche de Durham et un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu BLBVB du vert au jaune sont considérés comme positifs. L'exploitation des résultats s'effectue par la méthode du NPP (nombre le plus probable) qui se réfère à la table de Mac-Grady. Le résultat final sera exprimé en germes par gramme de produit analysé.

• **Recherche des coliformes fécaux et d'E. coli**

❖ Mode opératoire

Les tubes de VBL trouvés positifs dans le test précédent feront l'objet d'un repiquage à la fois dans d'autres tubes de VBL munis d'une cloche de Durham et dans des tubes d'eau péptonée exempte d'indole EPEI, l'incubation se fait à 44°C pendant 48h.

❖ Lecture

Les essais présentant à la fois un dégagement gazeux dans les tubes VBL et un anneau rouge en surface dans le tube EPEI après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de KOVACS seront considérés comme positifs. L'exploitation des résultats s'effectue par la méthode du NPP qui se réfère à la table de Mac-Grady, le résultat final sera exprimé en germes/g de produit analysé.

➤ **Recherche des Staphylococcus aureus (NF V 08-057-1)**

La recherche des Staphylococcus comporte une méthode de Baird Parker.

❖ Mode opératoire

A partir des dilutions décimales allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-3}$  porter 1ml de chaque dilution réparti en surface à raison de 3 fractions sensiblement égales dans trois boîtes contenant le milieu de Baird Parker puis étaler. Incuber à 37°C pendant 24 à 48 h.

❖ Lecture

Seront considérées comme positive, les boites contenant des colonies caractéristiques à savoir des colonies noires, brillant, convexes entourées d'une zone de transparence qui peut être translucide. Le nombre de colonies trouvé sera multiplié par l'inverse de sa dilution. Le résultat final sera exprime en germes/g de produit analysé.

### V.1. Caractérisation physico-chimique de l'huile d'olive

Les résultats des caractéristiques physico-chimiques de l'huile d'olive, obtenues lors de nos expériences sont récapitulés dans le tableau V.1.

**Tableau V.1** : Résultats des caractéristiques physico-chimiques de l'huile d'olive.

Caractérisation physico-chimique	Valeurs	Norme internationales
Acidité libre (%)	1.88	$\leq 2$
Indice d'acide	4.676	$\leq 6.6$
Indice de saponification	189.34	184-196
Indice de réfraction	1.4671	1.4677-1.4705
Indice de peroxyde	11.40	$\leq 20$

#### 1. Acidité

L'acidité d'une l'huile représente le pourcentage d'acide gras libres exprimé conventionnellement dans le cas de l'huile d'olive en acide oléique (COI, 1981).

Les résultats montrent que le pourcentage d'acidité de l'huile d'olive étudiée est de 1.88. Cette valeur reste dans les limites établies par le conseil oléicole international (COI, 2011), et permet de classer l'huile d'olive objet de notre étude dans la catégorie des huiles d'olive vierge.

#### 2. Indice d'acide

L'indice d'acide nous renseigne sur le taux d'acides gras libres existant dans l'huile. La valeur de l'indice d'acide pour l'échantillon de l'huile d'olive est de 4.676. Cette valeur est conforme aux normes internationales (COI, 2005).

#### 3. Indice de saponification

Le résultat propre à l'indice de saponification de l'huile d'olive est de 189.34. Cette valeur est située dans l'intervalle de la norme du codex alimentaire (1989) qui fixe entre 184 et 196 pour l'huile d'olive vierge.

#### 4. Indice de réfraction

La valeur de l'indice de réfraction détermine le degré d'insaturations des acides gras entrant dans la composition des matières grasses. L'indice de réfraction mesuré pour l'échantillon de l'huile d'olive étudiée est de 1.4671. Ce résultat est confirmé à la norme internationale (COI, 2005).

#### 5. Indice de peroxyde

L'examen de l'indice de peroxyde de huile étudiée est 11.40, cette valeur reste inférieure à la limite établie par la norme commerciale du conseil international pour l'huile d'olive vierge ( $\leq 20$ ).

### V.2. Elaboration et caractérisation d'une margarine

#### V.2.1. Caractérisation physico-chimique de la margarine

##### a. La teneur en eau.

Les résultats regroupés sur le tableau (V.2) annexe (3) et illustrés dans la figure (V.1) représentent la teneur en eau des différents essais qui sont comprise entre (23,75 et 38,51). Les formulations 5, 6 et 12 présentant les valeurs les plus basses de la teneur en eau, variant entre 26,05 ; 23,75 et 28,11 car ces échantillon contiennent des taux faible en eau (32,66 ; 32,33 et 35,25) respectivement. Pour les autres essais, une teneur en eau variant entre (30,04 à 38,51%) ont été trouvés.

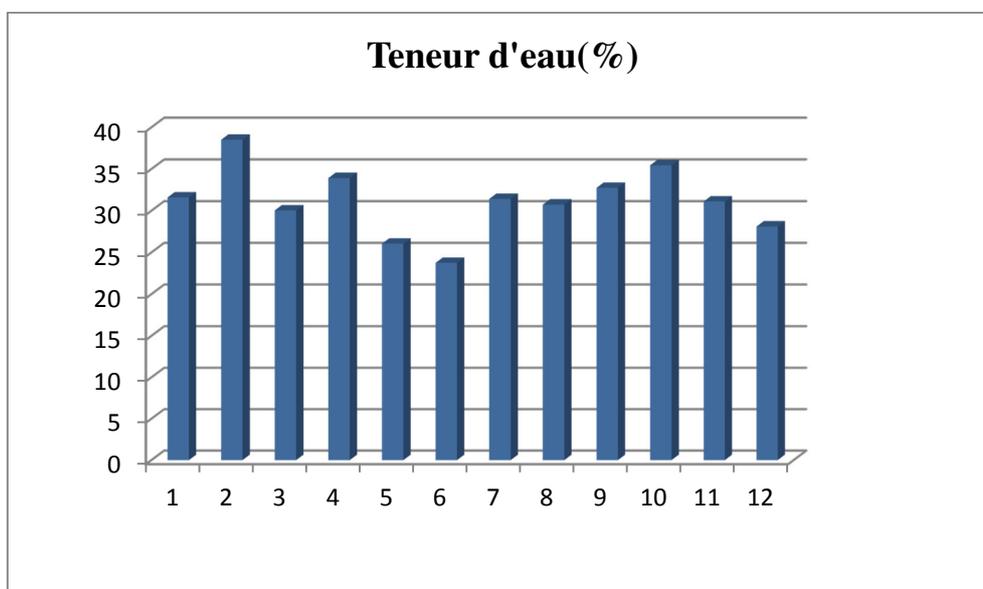
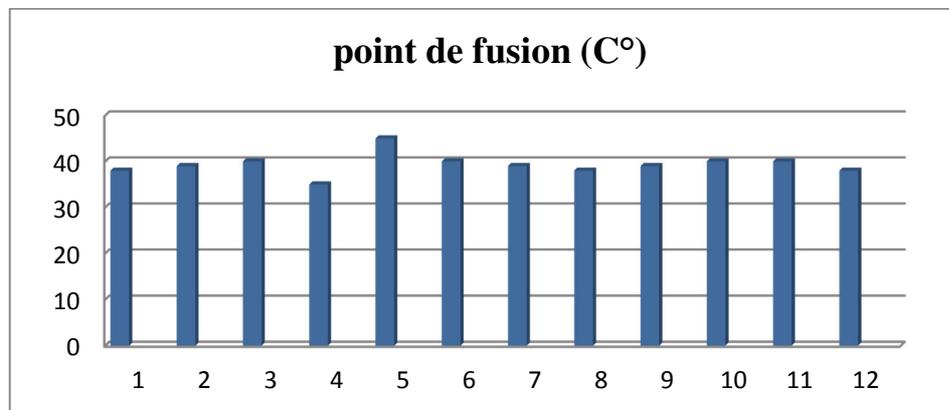


Figure V.1: La teneur en eau dans les différents essais.

**b. Point de fusion.**

Les valeurs du point de fusion de 12 essais représentée sur la figure (V.2) et le tableau (V.3) annexe (3).

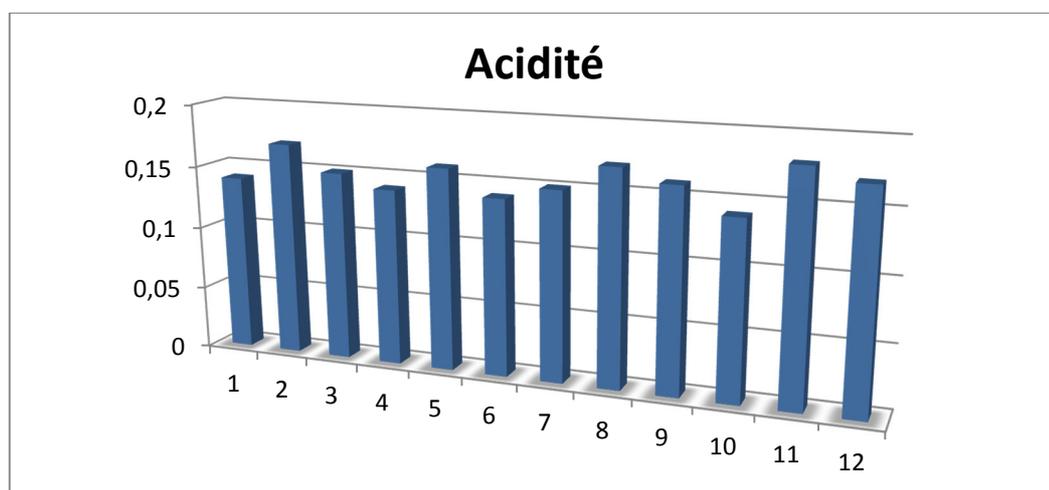


**Figure V.2 :** Les valeurs du point de fusion.

On remarque d'après cette figure que les valeurs du point de fusion de ces essais sont comprises dans l'intervalle de (35 à 40°C), ces valeurs sont globalement conformes avec les normes AFNOR.

**c. L'acidité.**

Les résultats de l'analyse de l'acidité sont illustrés dans la figure (V.3) et le tableau (V.4) annexe (3).



**Figure V.3:** L'acidité des différents essais

Les résultats illustrés sur cette figure révèlent des valeurs de l'acidité des douze essais qui sont comprises entre 0,14 et 0,18. Ces valeurs sont conformes avec les normes AFNOR qui indique la valeur d'acidité ( $\leq 0.2$ ).

#### d. Mesure du pH

Les résultats expérimentaux obtenus sont représentés dans le graphe qui met en évidence les variations du pH en fonction du temps. Les mesures ont été prises chaque jour pour une période de 10 jours. Suivant les résultats obtenus, La gamme de pH pour toutes les formulations est de 4,11 à 5,97. On remarque donc qu'il n'y a pas de changement significatif du pH pour les douze formulations. Ces valeurs sont conformes à la norme AFNOR qui se situent entre 4 à 5.

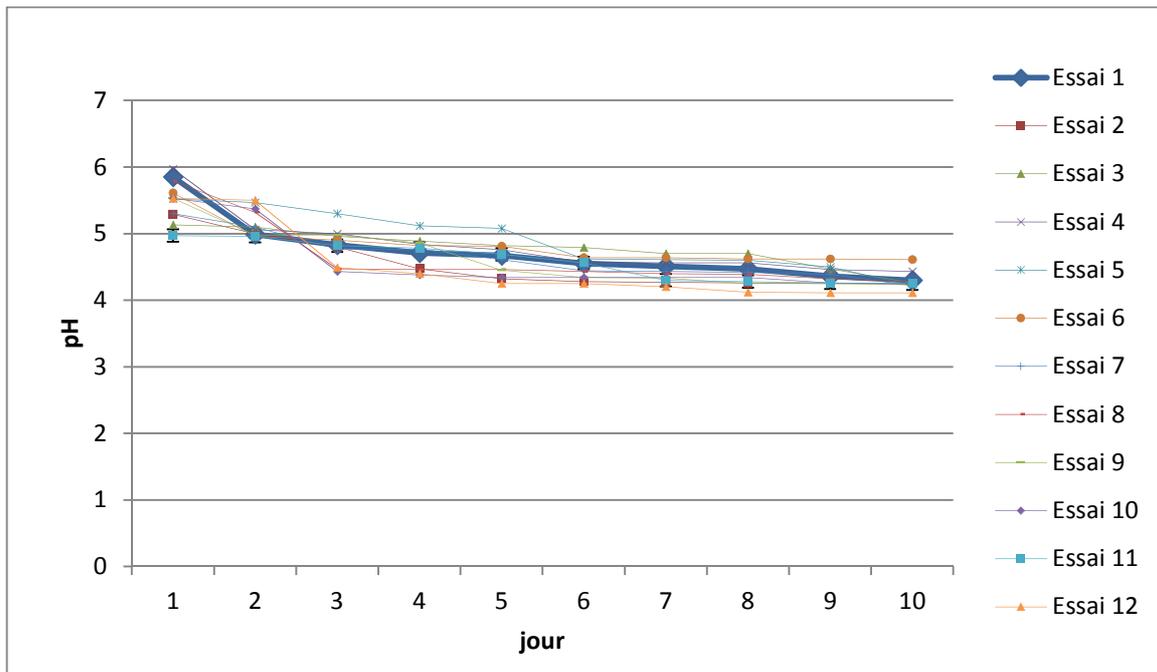


Figure V.4: variation du pH durant dix jours.

#### V.2.2. Etude de la stabilité microbiologique de la margarine diététique formulée.

Les résultats des analyses microbiologiques effectuées sur les différents essais, sont mentionnés dans le tableau suivant : pour estimer le degré de contamination des échantillons, nous avons procédé au dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux (GAMT), les levures, les moisissures, coliformes totaux, coliformes fécaux, Staphylococcus aureus.

**Tableau V.6:** Résultats des l'analyses microbiologiques.

Norme*	10 <sup>2</sup> /g	Abs	Abs	10	10
E12	0	Abs	Abs	Abs	0
E11	0	Abs	Abs	Abs	0
E10	25	Abs	Abs	Abs	0
E9	20	Abs	Abs	Abs	0
E8	0	Abs	Abs	Abs	0
E7	0	Abs	Abs	Abs	1
E6	0	Abs	Abs	Abs	0
E5	0	Abs	Abs	Abs	0
E4	0	Abs	Abs	Abs	0
E3	0	Abs	Abs	Abs	0
E2	15	Abs	Abs	Abs	2
E1	30	Abs	Abs	Abs	4
<b>Germes aérobies mésophiles Ufc/g</b>		<b>Coliformes totaux Ufc/g</b>	<b>Coliformes fécaux E.coli Ufc/g</b>	<b>Staphylococ cus aureus Ufc/g</b>	<b>Levures et moisissures Ufc/g</b>

Norme\* : Journal Officiel de la République Algériennes. (J.O.R.A.N :35 21 du 27 Mai 1998).

D'après les résultats obtenu, illustrés dans le tableau (V.6) révèlent l'absence totale des micro-organismes recherchés à savoir :

- Les germes aérobies mésophiles totaux (GAMT),
- Les levures, les moisissures,

- Les coliformes totaux et coliformes fécaux.
- Staphylococcus aureus.

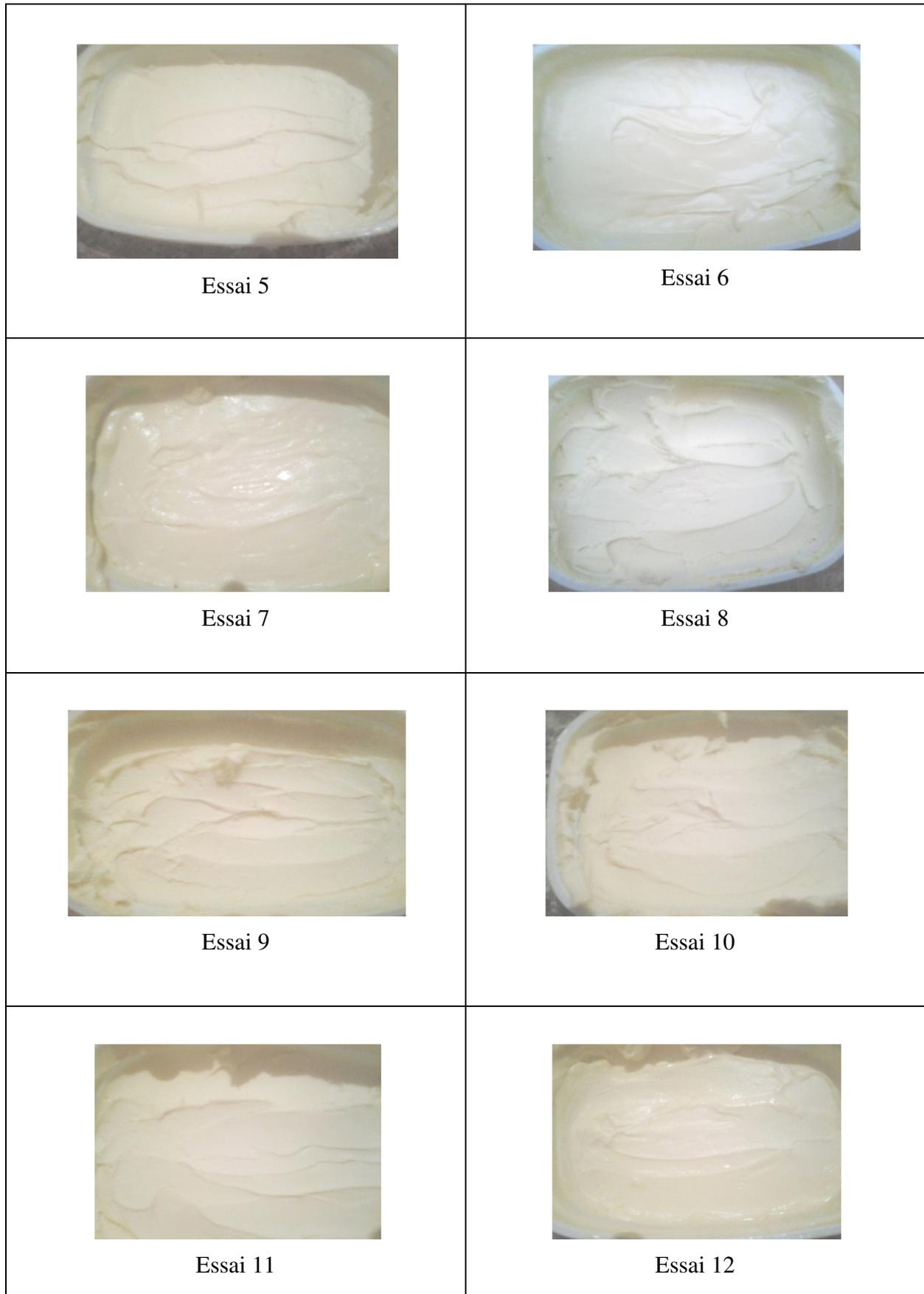
Ces résultats montrent que les échantillons sont formulés dans des conditions d'hygiène et ne représentent pas un milieu favorable au développement de ces micro-organismes.

### V.2.3. Tests organoleptiques

Après avoir sélectionné pour chaque produit les termes de tartinabilité, texture, aspect, couleur et odeur que nous avons trouvés les plus pertinents et les plus appropriés à la description des produits.

Les différentes formulations établies sont illustrées sur les figures ci-après:





**Figure V.5** : Photographie des formulations établies.

Le calcul des résultats se fait par la suite sous forme de moyennes obtenues pour chaque attribut. (Voir tableau).

	TARTINABILITE	TEXTURE		APSPET	COULEUR	ODEUR
		Doux	Crémeux			
Essai 1	8,57	8,14	7,57	8	7,28	6,14
Essai 2	5,85	4,14	4,71	5,42	6,71	6,28
Essai 3	6,14	4,42	4,71	6,14	7,42	7
Essai 4	8,14	7,57	6,57	3,85	3,57	6,28
Essai 5	7,28	6,71	7,71	4,85	2,57	6,85
Essai 6	9,28	8,57	7,28	8	8,57	6,85
Essai 7	9,42	6,28	6,85	7,57	8,14	6,85
Essai 8	8,57	8,85	7,57	7,71	8,57	6,71
Essai 9	9,42	9,28	7,71	8,25	6,71	6
Essai 10	8,71	6,85	7,71	7,71	6,71	7,42
Essai 11	8,71	8,57	7,85	7,28	8,57	7,71
Essai 12	8,57	7,57	8,28	8,85	7,57	6,14

D'après les résultats illustrés sur le tableau ci-dessus, l'examen organoleptique des douze essais révèle que les douze essais présentent une bonne tartinabilité, et une bonne texture (Doux, Crémeux). Cependant pour l'aspect, l'essai 12 présente le meilleur aspect.

Concernant la couleur, on remarque que l'essai 5 présente une couleur inacceptable par rapport à l'essai 6, 8 et 11 de couleurs acceptables et attrayantes. En revanche, une odeur caractéristique acceptable pour les douze essais a été ressentie.

***Discussion générale :***

L'extraction et la purification des phytostérols à partir de l'huile d'olive ont été réalisées dans des conditions optimales mettant en évidence les performances des procédés mis en œuvre et la délicatesse de récupération de ces produits qualifiés de minoritaires dans les espèces végétales

Le problème crucial rencontré dans la réalisation de ce travail est le manque de moyens de caractérisation des extraits notamment la chromatographie liquide haute performance. L'absence de produits étalons a constitué le point négatif pour cette étude qui est toujours en cours afin de parfaire ce volet très important et indispensable pour tout produit d'origine organique.

## Conclusion

---

L'objectif de ce présent travail consiste dans une première étape en la caractérisation physico-chimique d'une variété d'huile d'olive de la région de Bédjaia, et valoriser par la suite les extraits insaponifiables riches en phytostérols dans la formulation d'un margarine diététique allégée.

Les résultats de l'analyse physico-chimique de l'huile d'olive étudiée ont révélé que :

- ❖ L'acidité, l'indice d'acide, l'indice de saponification, l'indice de réfraction et l'indice de peroxyde de cette variété sont très proches de celles de l'huile d'olive vierge et par conséquent lui confèrent cette qualité très appréciée et recommandée dans l'hygiène alimentaire.
- ❖ L'extraction par solvants de la partie insaponifiable a montré que l'hexane est un bon solvant, ceci est justifié par le rendement important en produit récupéré après évaporation complète du solvant.
- ❖ Les essais de formulation d'une margarine enrichie en phytostérols moyennant la stratégie expérimentale des plans d'expériences ont permis de mettre au point douze formules optimales ayant les caractéristiques de qualité recherchées.
- ❖ Les résultats de l'analyse physico-chimique de notre margarine révèlent les critères physico-chimiques (la teneur en eau, acidité, pH, point de fusion) conformes à la recette préétablie.
- ❖ Les résultats de l'analyse microbiologique obtenus montrent l'absence totale des germes aérobies, des levures, des moisissures, des coliformes totaux et coliformes fécaux, ainsi que les staphylococcus aureus, ce résultat est très encourageant car il semble montrer le double effet des phytostérols, en plus de leur action immédiate sur la santé en réduisant l'absorption du cholestérol par l'intestin, ils contribuent à la conservation de la margarine en diminuant le risque des altérations dues à l'oxydation et à l'hydrolyse.

## Conclusion

---

Enfin, ce travail ne constitue qu'une goutte dans l'océan de la recherche et reste à ce stade inachevé et incomplet du fait que l'identification des principaux composants de l'extrait, en l'occurrence les phytostérols n'a pas été réalisée par manque de moyens d'analyse adéquat

Et par conséquent ouvre de nouvelles perspectives et recommandations :

- ❖ Réaliser les séparations des différents constituants de l'extrait par chromatographie liquide haute performance, par chromatographie sur couche mince et par d'autres techniques chromatographiques plus sophistiqués.
- ❖ Déterminer la teneur exacte en cholestérol dans la margarine formulée allégée pour prouver que ce composé a été considérablement réduit par l'effet des phytostérols.
- ❖ Evaluer les qualités nutritionnelles des produits formulées afin de convaincre les industriels de ce nouveau produit.

Toutes ces recommandations seront pris en considération dans les travaux futures afin de mettre au point des produits diététiques qui répondent aux exigences du consommateur très soucieux de ces problèmes de santé.

## Références bibliographiques

- [1] **AFNOR, 1982.** Recueil de normes française des produits dérivés des fruits et légumes jus de Fruits. Ed.AFNOR, p325
- [2] **AFNOR, 1984.** Corps gras –graines oléagineuses- produits dérivés, 4ème édition, Paris, P: 459.
- [3] **Alicia AYERDI GOTOR. 2008.** Étude des variations des teneurs et de la variabilité Des compositions en tocophérols et en phytostérols dans les akènes et l'huile de tournesol (*Helianthus annuus L.*) Thèse de *Doctorat*. P27, 34
- [4] **Alim L et Zouambia K, (2007).** Contrôle de la qualité physico-chimique et organoleptique de quelques huiles d'olive. p55
- [5] **Ahmad M. , Clyde S .,1992.** Les matières grasses destinées aux produits de boulangerie. Que sont-elles ? comment fonctionnent –elles. United Soybean Board
- [6] **Angerosa, F, 2002.** Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels. *European Journal of lipid Science and technology*, 104 (9-10): 639-660.
- [7] **Argenson .C. et Régis .S.** L'olivier octobre 1999. (Livre) P8, 170
- [8] **Awad, A. B. and C. S. Fink, 2000.** "Phytosterols as anticancer dietary components: Evidence and mechanism of action". *Journal of Nutrition* **130** (9): 2127-2130.
- [9] **Becher.P, 1976.** Emulsion- La théorie et pratique, 2<sup>ème</sup> édition. ACS Manographe n° 162, Société publishing de Reinhold.
- [10] **BENABID Hamida, 2009.** Caractérisation de l'huile d'olive algérienne apports des méthodes chimométriques (thèse de doctorat) P11, 12, 15, 26, 30,31
- [11] **BENRACHOU NORA, 2012.** Etude des caractéristiques physicochimiques et de la composition biochimique d'huiles d'olive issues de trois cultivars de l'Est algérien. P35
- [12] **Boscou, D.,1996.** Olive Oil Composition. In *Olive Oil: Chemistry and Technology*. AOACS Press, USA, 52-83, 85-127.
- [13] **Bouic, P. J. D., A. Clark, J. Lamprecht, M. Freestone, E. J. Pool, R. W. Liebenberg, D. Kotze and P. P.van Jaarsveld .,1999.** "The effects of  $\beta$ -sitosterol (BSS) and  $\beta$ -sitosterol glucoside (BSSG) mixture on selected immune parameters of marathon runners: Inhibition of post marathon immune suppression and inflammation". *International Journal of Sports Medicine* **20** (4): 258-262.

- [14] **Bradford, P. G. and A. B. Awad., 2007.** "Phytosterols as anticancer compounds". *Molecular Nutrition & Food Research* **51** (2): 161-170.
- [15] **Bruneton,J., 2009.** *Pharmacognosie, phytochimie.plantes médicales* 4<sup>ème</sup> édition .Lavoisier.pp.717-719
- [16] **Burton G.W., Ingold K.U., 1986.** Vitamin E: Application of the principles of physical organic Chemistry to the exploration of its structure and function. *Accounts of Chemical Research.* 19 pp 194-201.
- [17] **Calpe-Berdiel, L., J. C. Escola-Gil, V. Ribas, A. Navarro-Sastre, J. Garces-Garces and F. Blanco-Vaca., 2005.** "Changes in intestinal and liver global gene expression in response to a phytosterol-enriched diet". *Atherosclerosis* **181** (1): 75-85.
- [18] **CNUCED (Conférence des Nations Unies sur le Commerce et le Développement) (2005).** Information sur l'huile d'olive ; le marché : produit et consommation .<http://WWW.olivierdeprovence.com/odpce-fr /huile-olive-cassification.php>
- [19] **Commission of the European Communities. 1991.** Regulation No. 2568/91 of 11 July and later modifications on the characteristics of Olive Oil and Olive-residue Oil and on the relevant Methods of Analysis. *Official Journal of the European Communities*, No L248, 1-82.
- [20] **Codex alimentary, 1989.** Norme codex pour les huiles d'olive vierges et raffinées et pour l'huile de grignons d'olive raffinée. *Codex STAN 33-1981 (Rév. 1-1989).*
- [21] **C.O.I., 1981.**Caractéristiques de la composition des huiles d'olives .T. 15 / Doc n°23.Madrid
- [22] **C.O.I., 2005.** Norme commerciale applicable à l'huile d'Olive et à l'huile de grignons d'olive. *COI/T. 15/NC n°2/Rev.10.*
- [23] **Conseil Oléicole International., 2010.** Norme commerciale applicable aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive.
- [24] **COI T. 15/NC n° 3/Rev. 6.** Norme commerciale applicable aux huiles d'olive et aux l'huiles de grignons d'olive : 2011
- [25] **Cossut, J. Defrenne, B. Desmedt, C. Ferroul, S. Garnet, S. Humbert, S. Roelstraete, L. Vanexeem, M. et Vidal, D., 2002.** *Les corps gras : Entre Tradition et Modernité. Projet en Gestion de la qualité Nutritionnelle et Marketing des produits alimentaires.* 139p.
- [26] **DJADOUN SADIA.** Influence de l'hexane acidifié sur l'extraction de l'huile de grignon d'olive assisté par micro-onde .P15-16 ; 22

- [27] **Djouab A mran ,2007.** Préparation et incorporation dans la margarine d'un extrait de dattes des variétés sèches.P68, 72
- [28] **Dutta, P. and L. Normen, 1998.** "Capillary column gas- liquid chromatographic separation of delta 5- unsaturated and saturated phytosterol". Journal of Chromatography A 816: 177-184.
- [29] **Dylan S. MacKay M.Sc.,Peter J. Jones Ph.D.,** Le rôle des phytostérols et les maladies cardiovasculaires .La Revue Whitehall-Robins. Mars 2010 - Volume 19, Numéro 1. Université du Manitoba, Canada.
- [30] **European Community,1995.** European Parliament and Council Directive No 95/2/EC. Foods Additives other than colours and sweeteners.: 1-40.
- [31] **Faur L.,1992.** Manuel des corps gras ,Transformation des corps gras a des fins Alimentaires (Tome 2) .Ed. Tec et Doc Lavoisier, Paris, 1579p.
- [32] **FDA.,2007, 10 Août 2007.** "Food and drugs. Food labeling. Specific requirements for health claims.Health claims: plant sterol/stanol esters and risk of coronary heart disease." Retrieved 14 Août 2007, 2007
- [33] **Fedeli E.,1977.** Lipids of olives. Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids. 15 pp 57-74.
- [34] **Field, F. J., N. T. P. Kam and S. N. Mathur (1990).** "Regulation of cholesterol metabolism in the intestine". Gastroenterology 99: 539-551.
- [35] **Flahault., 2000.** Encyclopédie mondiale de l'olivier .Edition COI,p37.
- [36] **Fredot E.,2005.** connaissance des aliments: base alimentaire et nutritionnelles de la diététique. Ed. Tec et Doc Lavoisier, 397p
- [37] **Friberg.s., 1976.** Food emulsion, Dekker Inc, New York.
- [38] **Girard J.P., 2006.** Prise en charge des hypercholestérolémies de l'enfant. Archives de Pédiatrie, Paris, : 104-110.
- [39] **Gutiérrez, F. Jimenez, B. Ruiz, A. et Albi, MA., 1999.** Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties picual and hojiblanca and on the different components involved. J. Agric. Food. Chem, 47 : 121-127.
- [40] **Ho S. et Pal S., 2005.** Margarine phytosterols decrease the secretion of atherogenic lipoproteinsfrom HepG2 liver and Caco2 intestinal cells .*Atherosclerosis*, 182: 29-36

- [41] **Ikeda, I., K. Tanaka, M. Sugano, G. V. Vahouny and L. L. Gallo., 1988.** "Inhibition of cholesterol absorption in rats by plant sterols". *Journal of Lipid Research* **29** (12): 1573-1582.
- [42] **ISO-3657-1988:** Corps gras d'origine animale et végétale. Détermination de l'indice de saponification.
- [43] **ISO-6320-1995:** Corps gras d'origine animale et végétale. Détermination de l'indice de réfraction.
- [44] **Jouve .J-L ., 1996.** La qualité microbiologique des aliments, Maitrise et critères, polytechnique ,P :140-144
- [45] **Karleskind A., 1992.** Manuel des Corps Gras, Tech. & Doc. Lavoisier, tome (I-II), pp:938-989, p768, p1571
- [46] **Kerboua, M., 2003.** La production et la consommation d'huile d'olive à l'horizon 2010 en Algérie.*Olivea*, 99 :56-58.
- [47] **Kiritsakis, A. et Markakis, P., 1987.** Olive oil: a review. *Adv. Food Res*, 31: 453-482.
- [48] **Kristott, J.,2000.** Fats and oils. In D. Kilcast, and P. Subramaniam (Eds.), the stability and shelf-life of food.Boca Raton, Boston, New York and Washington, DC : CRC Press, 279-309.
- [49] **Köhler.,1887.** Kohler's Medicinal Plants (Kohler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erlauternde Texte : Atlas zur Pharmacopoea germanica), **2**: p155.
- [50] **Laurie B . , Mathilde R., 2008 -** La margarine est-elle une bonne alternative au beurre. Heds,haute école de santé Genève, : 1-6.
- [51] **Law, M.,2000.** "Plant sterol and stanol margarines and health." *British Medical Journal* **320**(7238): 861-864.
- [52] **LOUSSERT ET BROUSSE G., 1978.** L'olivier .Ed. Maisonneuve et la rose. P335-364.
- [53] **Luterotti S., Bicanic D., Poizgaj R .,2006 .**New simple spectrophotometric assay of total carotenes in margarines. *Analytica Chimica Acta*, 573-574,pp 466-473.
- [54] **Maroun, I., 2002.** La filière oléicole au Liban.
- [55] **MASSERA A.M.** Liposoma dell'insaponificabile di oilio da olive. Determinazione quantitativa della quota liposomata – *Cosmetics*, **16 (93)** : 401-407 (1993).
- [56] **Médawar, S. (2001a).** L'olivier, situation au Liban, technique de culture et étude de faisabilité. Publication : Institut libanais de développement économique et social, 23 pages.

- [57] **Merrien, A., J. Morice, A. Pouzet, O. Morin and C. Sultana., 1992.** Graines oléagineuses des climats tempérés et leurs huiles. Manuel des Corps Gras. A. Karleskind. Paris, Tec&Doc. **1**: 116-164.
- [58] **Mietitinen TA.,Puska P., Gylling H. , Vandhanen H. ,Vartiainen E .,1995 -** Reduction of serum cholestrol with sistostanol-ester margarine in a mildlyhypercholestrolemic population .*The New Englend journal of Medicine* , 333, :1308-1312
- [59] **Mississauga .ON et Vancouver, C-B(2008).** Phytostérols et stanols Complémentaires à une saine alimentation
- [60] **Musner M.J,Parhofer KG ,Bergmann KV,Schwandt P,Broedl U,Otto C.,2002-** Effectsof phytosterol ester-enriched margarine on plasma lipoproteinsin mild to moderate hypercholesterolemia are related to basal cholesterol and fat intake.*Metabolism*,51(2) :189-194.
- [61] **Normen, L., P. Dutta, A. Lia and H. Andersson., 2000.** "Soy sterol esters and beta-sitostanol ester as inhibitors of cholesterol absorption in human small bowel". American Journal of Clinical Nutrition **71** (4): 908-913.
- [62] **Ouaini, N. Medawar, S. Daoud, R. Ouaini, R. Chebib, H. Rutledge, D. et Estephan, N., 2005.** Etat actuel des huileries d'olive au Liban. Potentiel de production. New Medit, N4 : 31-35.
- [63] **Owen, RW. Giacosa, A. Hull, WE. Haubner, R. Spiegelhalder, B. et Bartsch, H. (2000a).** The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. Eur J Cancer, 36: 1235-47.
- [64] **Patrick LANGER., 2008.** L'olivier.p49 (livre)
- [65] **Pérez, A.G. Luaces, P. Ríos, J.J. Garcia, J.M. et Sanz, C., 2003.** Modification of volatile compound profile of virgin olive oil due to hot-water treatment of olive fruit. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 6544-6549.
- [66] **PLATON J-F.** Les lipides en cosmétologie - *OCL*, **4(4)** : 275-281(1997).
- [67] **Psomiadou, E. Tsimidou, M. et Boskou, D., 2000.** Alpha-tocopherol content of Greek virgin olive oil. J Agric. Food Chem, 48: 1770-1775.
- [68] **Rebour, H., 1948.** Situation actuel de l'olivier en Algérie .Série économique numéro 36.p6
- [69] **Samaniego-Sanchez C., Quesada-Granados J.J., Lopez-Garcia H., De La Serrana M.C., Lopez-Martinez J., 2010.** Beta-Carotene, squalène and waxes determined by

chromatographic method in Picual extra virgin olive oil obtained by a new cold extraction system. *Journal of Food Composition and Analysis* 23, 671–676.

[70] **Sébastien Veillet ., 2010.** Enrichissement nutritionnel de l'huile d'olive : Entre Tradition et Innovation .Thèse. P28 ; 35 ; 30

[71] **Serfaty-Lacrosnier C, Nigon F, Chauvois D, Neveu C, Chapman J, Bruckert E., 2001-** Les phytostérols: Une nouvelle approche dans la prise en charge diététique de l'hypercholestérolémie. *Cahiers de Nutrition Et de diététique*, 36, 145.-341 -347.

[72] **Sier.** Informations et techniques. 1993. n°6

[73] **Sudhop, T., Y. Sahin, B. Lindenthal, C. Hahn, C. Lüers, H. K. Berthold and K. Von Bergmann., 2002.** "Comparison of the hepatic clearances of campesterol, sitosterol, and cholesterol in healthy subjects suggests that efflux transporters controlling intestinal sterol absorption also regulate biliary secretion". *Gut* 51: 860-863.

[74] **Tapiero, H., D. M. Townsend and K. D. Tew., 2003.** "Phytosterols in the prevention of human pathologies." *Biomedicine and Pharmacologie* 57: 321-325.

[75] **Tateo, E. Brunelli, N. Cucurachi, S. et Ferillo, A., 1993.** New trends in the study of the merits and shortcomings of olive oil in organoleptic terms, in correlation with the GC/MS analysis of the aromas In *Food Flavours, Ingredients and Composition*, G Charalampous, editor, Elsevier Science publishers B V Amsterdam.

[76] **Trautwein, E. A., G. Duchateau, Y. G. Lin, S. M. Mel'nikov, H. O. F. Molhuizen and F. Y. Ntanos., 2003.** "Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plant sterols". *European Journal of Lipid Science and Technology* 105 (3-4): 171-185.

[77] **Ucciani, E.,** Nouveau Dictionnaire des Huiles Végétales. Composition en Acides Gras., Tec et Doc, Lavoisier. Paris, (1995) 125-128.

[78] **Uceda, M. et Hermoso, M., 1996.** La calidad del aceite de oliva. In : *El Cultivo del Olivo*. Eds. D. Fernandez-Escobar, L.Rallo. Mundi-Prensa, Madrid (Spain), 541-563.

[79] **Venkateshwarlu, G. Let, M.B. Meyer, A.S. et Jacobsen, C., 2004**

Modeling the sensory impact of defined combinations of volatile lipid oxidation products on fishy and metallic off-flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22):6564-6571.

[80] **Verleyen, T., 2002.** Stability of minor components during vegetable oil refining. *Applied biological sciences: chemistry*. University of Gent. Gant. 277.

[81] **Vogt A. , Thomas H. , Schulze S. , Steinhagen-Thiessen E. , Kassner U., 2004 -**

Effect of phytostrol ester-enriched margarine and diet compared to diet on plasma lipids in hypercholéstrolemic subjects . Congress , Seville ,Spain, 156-146p.

[82] **Zangenberg, M.H.B.Hansen, J.R.Jorgensen and L.I.Hellgren., 2004.** "Cultivar and year-TO-year variation of phytosterol content in rye (*Secale cereal L.*). "Journal of Agriculture and Food Chemistry 52(9): 2593-2597.

## Annexe 1

### Verreries et autres

- Ballon de 250ml
- Béchers
- Réfrigérant à reflux
- Bain marie
- Boite de pétrie
- Ampoule à décanter
- Fioles
- Erlenmeyer
- Entonnoir
- Papier filtres
- Pipettes
- Spatule
- Tube à essai
- Thermomètres
- Tube capillaires

### Réactifs et solutions

- Potasse alcoolique
- Hexane
- Ethanol( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ )
- Sulfate de sodium anhydre
- Eau distillée
- Hydroxyde de potassium( $\text{KOH}$ )
- Toluène( $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ )
- Phénophtaléine
- Acide chlorhydrique( $\text{HCL}$ )
- Thiosulfate de sodium( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )
- Chloroforme( $\text{CHCL}_3$ )
- Acide acétique( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )
- Iodure de potassium
- Acide citrique
- Sel
- Gélose glucosée à l'oxytétracycline (OGA)
- Gélose PCA
- Eau physiologique peptinée (TES)
- Eau peptonée exempte d'indole (EPEI)
- Réactif de kovacs

## Annexe 2

### Appareillage



Plaque chauffant



Balance



pH mètre



Dessiccateur



étuve



Réfractomètre

### Annexe 3

**Tableau V.2 :** la teneur en eau dans les différents essais

Essai	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
H%	31.59	38.51	30.04	33.92	26.05	23.75	31.42	30.74	32.74	35.45	31.11	28.11

**Tableau V.3 :** Les valeurs du Point fusion

Essai	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Point de fusion (C°)	38	39	40	35	45	40	39	38	39	40	40	38

**Tableau V.4 :** L'acidité des différents essais

Essai	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Acidité %	0,14	0,17	0,15	0,14	0,16	0,14	0,15	0,17	0,16	0,14	0,18	0,17

**Tableau V.5:** les valeurs de pH pour chaque essai

❖ **1essai**

jour	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH	5.85	4.99	4.83	4.71	4.67	4.55	4.51	4.47	4.36	4.30

❖ **2essai**

jour	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH	5.29	5.0	4.80	4.47	4.32	4.28	4.27	4.26	4.25	4.25

❖ 3essai

jour	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH	5.13	5.10	4.96	4.89	4.82	4.79	4.70	4.70	4.47	4.26

❖ 4essai

jour	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH	5.97	5.06	5.0	4.84	4.76	4.57	4.56	4.56	4.46	4.43

❖ 5essai

jour	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH	5.52	5.47	5.30	5.12	5.08	4.62	4.61	4.60	4.50	4.22

❖ 6essai

jour	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH	5.61	4.96	4.90	4.82	4.81	4.64	4.64	4.62	4.62	4.61

❖ 7essai

jour	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH	5.30	5.10	4.77	4.77	4.61	4.44	4.43	4.42	4.39	4.22

❖ 8essai

jour	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH	5.79	5.32	4.47	4.46	4.46	4.43	4.40	4.39	4.32	4.28

❖ 9essai

jour	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH	5.53	4.98	4.98	4.86	4.45	4.34	4.33	4.25	4.25	4.23

❖ 10essai

jour	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH	5.53	5.37	4.43	4.38	4.34	4.34	4.34	4.34	4.26	4.26

❖ 11essai

jour	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH	4.97	4.96	4.82	4.78	4.69	4.56	4.30	4.28	4.26	4.25

❖ 12essai

jour	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pH	5.53	5.50	4.49	4.40	4.25	4.25	4.20	4.12	4.11	4.11

## Annexe 4

Tableau : Table de Mac-Grady

Nombre caractéristique	Nombre de micro-organismes
000	0.0
001	0.3
010	0.3
011	0.6
020	0.6
100	0.4
101	0.7
102	1.1
110	0.7
111	1.1
120	1.1
121	1.5
130	1.6
200	0.9
201	1.4
202	2.0
210	1.5
211	2.0
212	3.0
220	2.0
221	3.0
222	3.5
223	4.0
230	3.0
231	3.5
232	4.0
300	2.5
301	4.0
302	6.5
310	4.5
311	7.5
312	11.5
313	16.0
320	9.5
321	15.0
322	20.0
323	30.0
330	25.0
331	45.0
332	110.0
333	140.0

## Annexe 5

Table de NPP

1*50ml	5*10ml	5*1ml	Nombre caractéristique	Limite d'inférieur	supérieur
0	0	0	<1		
0	0	1	1	<0.5	4
0	0	2	2	<0.5	6
0	1	0	1	<0.5	4
0	1	1	2	<0.5	6
0	1	2	3	<0.5	8
0	2	0	2	<0.5	6
0	2	1	3	<0.5	8
0	2	2	4	<0.5	11
0	3	0	3	<0.5	8
0	3	1	5	<0.5	13
0	4	0	5	<0.5	13
1	0	0	1	<0.5	4
1	0	1	3	<0.5	8
1	0	2	4	<0.5	11
1	0	3	6	<0.5	15
1	1	0	3	<0.5	8
1	1	1	5	<0.5	13
1	1	2	7	1	17
1	1	3	9	2	21
1	2	0	5	<0.5	13
1	2	1	7	1	17
1	2	2	10	3	23
1	2	3	12	3	28
1	3	0	8	2	19
1	3	1	11	3	26
1	3	2	14	4	34
1	3	3	18	5	53
1	3	4	21	6	66
1	4	0	13	4	31
1	4	1	17	5	47
1	4	2	22	7	59
1	4	3	28	9	85
1	4	4	35	12	10
1	4	5	43	15	120
1	5	0	24	8	75
1	5	1	35	12	1
1	5	2	54	18	140
1	5	3	92	27	220
1	5	4	160	39	450
1	5	5	240		