

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences et de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Alimentaires
Filière : Sciences Biologique
Spécialité : Sciences Alimentaires
Option : Corps gras



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Conservation de la margarine par des extraits
de grenade (*Punicagranatum L.*)**

Présenté par :

BELAID Lyes

Soutenu le : **18 septembre 2016**

Devant le jury composé de :

- ❖ **Président : M^r BOUDRIES H.**
- ❖ **Examineur : M^{me} ADRAR S.**
- ❖ **Promoteur : M^{me} CHOUGUI N.**
- ❖ **Invité : M^{me} AIDLI A.**

Année universitaire : 2015 / 2016

Remerciements

Avant tout, je tiens à remercier celui qui m'a créé, protégé, aidé et qui m'a donné entre bien d'autres, la patience et le courage pour accomplir entre autres mon mémoire Master dans les meilleures conditions en disant « Dieu Merci ».

*Je tiens à remercier **M^r BOUDRIES H.** pour l'honneur qu'il me fait de présider le jury et d'évaluer ce travail et **M^{me} ADRAR S.** pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Ce mémoire n'aurait jamais été entrepris ni achevé sans la patiente assistance, les savants conseils et orientations, les méticuleux contrôles et suivis, que m'a prodigué ma promotrice, **M^{me} CHOUGUI N.**, je lui témoigne ici, toute ma gratitude et ma reconnaissance.*

*Je tiens à remercier **M^{me} AIDLI A.** pour ce travail, de sa disponibilité et ses conseils.*

Je remercie le personnel de l'entreprise CO.G.B La belle : M^{me} Seddiki, M^r Moured, M^{me} Wahiba, M^{me} DJAAFRI, M^{me} A. RIAD et le laboratoire de Technologie alimentaire, tout particulièrement M^{me} Saida pour m'avoir accueilli et permis d'effectuer les différents tests et analyses et pour avoir mis à ma disposition le matériel et les moyens nécessaires à la réalisation de certaines parties de ce travail.

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour

A ceux qui m'ont encouragée et soutenue dans mes moments les plus difficiles

Et ceux à qui je dois tant

A mes chers parents pour leur amour et leur support continu

Que ce travail soit le témoignage sincère et affectueux de ma profonde reconnaissance pour tout ce que vous avez fait pour moi.

A mes grands-mères.

A mes frères et sœurs.

A mes oncles et tantes.

A mes cousins et cousines.

A mes amis (es) : Moured, Oussama, Farid, Azwaw, Ghanou, Salim , khaled.

Lyes

Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation

AgCL : Chlorure d'Argent

AgNO₃ : Nitrate d'Argent

AlCl₃ : Chlorure d'Aluminium

BHA : Butyl HydroxyAnisol

BP : Bard Parker

DPPH :Diphénylpycrylhydrazyl

EAG : Equivalent en AcideGallique

EC : Equivalent en Cyanidine

FAO : Food and Agriculture Organization

Fe₂(SO₄)₃ : Sulfate de fer

FeCl₃ : Chlorure ferrique

FROs : Forme Réactive de l'Oxygène

HCl : Acide Chlorhydrique

ISO : Organisation Internatoinal de Standardisation

MF : Matière Fraiche

MS : Matière Séche

ME: Margarine Elaborées

NE : Norme d'Entreprise

PCA : Plate Count Agar

pH : Potentiel Hydrogène

ppm : Partie par million

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SFB : Bouillon au sélénite de Sodium

UFC : UnitéFormant une Colonie

UV : Ultra-violet

Vit. : Vitamine

VRBL : Gélose Biliée Lactosée au cristal Violet et au Rouge neutre

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Photographie de la grenade (<i>Punicagranatum L.</i>)	03
02	Structure chimiques d'un tanin hydrolysable et d'un tanin condensé	07
03	Structure de base d'un flavonoïde	07
04	Structure des anthocyanosides	08
05	Schéma général de fabrication de la margarine	13
06	Schéma général de l'oxydation des lipides	15
07	Mécanisme d'initiation de la peroxydation des lipides par l'activité lipoxygénasique	16
08	Structure de l' -tocophérol	17
09	Photographies de la grenade (A), de graines de grenade (B), de l'écorce de grenade séchée (C), de la poudre d'écorces de grenade (D)	20
10	Protocole d'extraction des composés phénoliques de la poudre d'écorces de grenade	22
11	Pouvoir réducteur d'extrait d'écorces de grenade et des standards (Quercetine et BHA)	35
12	Pourcentages d'inhibition du radical DPPH par l'extrait d'écorces de grenade et des standards (BHA, Quercetine)	36

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Classification botanique de la grenade (<i>Punicagranatum L.</i>)	03
II	Composition chimique du fruit de la grenade	04
III	Valeurs nutritives de la grenade	05
IV	Caractéristiques de la variété de grenade <i>Lahlou</i>	19
V	Les ingrédients des margarines élaborées	26
VI	Germes recherchés dans les margarines élaborées et les conditions d'analyse	30
VII	Paramètres physico-chimiques du jus de grenade	32
VIII	Teneurs des écorces de grenade en antioxydants	34
IX	Propriétés physico-chimique des margarines élaborées à l'échelle laboratoire	37
X	Taux de solide des 4 margarines élaborées (%)	39
XI	Propriétés microbiologiques des margarines élaborées	40

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1

Partie théorique

Chapitre I : la grenade

Généralités.....	2
1.1.Origine géographique.....	2
1.2.Description botanique.....	2
1.3.Composition des écorces de grenade.....	3
1.4.Composition chimique du fruit de la grenade.....	4
1.5.Composés phénoliques de la grenade.....	5
1.6.Usages de la grenade.....	8

Chapitre II : la margarine et l'oxydation des lipides

1. Généralités sur la margarine.....	10
1.1.Historique.....	10
1.2.Définition.....	10
1.3.Composition globale des margarines.....	10
1.4.Fabrication des margarines.....	11
1.5.Classification des margarines.....	11
1.5.1. Margarines à destination des professionnels.....	11
1.5.2. Margarines de tables traditionnelles.....	11
1.5.3. Margarines de table allégées et « santé ».....	12
1.5.4. Margarines de table riches en acides gras insaturés.....	12
1.5.5. Margarines de tables enrichies en stérols végétaux.....	12
1.6.Altération de la margarine.....	12
2. Oxydation et antioxydants.....	14
2.1.Oxydation.....	14
2.1.1.Types d'oxydation et leurs mécanismes.....	14
2.1.2.Impact de l'oxydation des corps gras.....	16
3. Moyens de lutte contre l'oxydation des lipides.....	16

3.1.Les antioxydants synthétiques : La vitamine E.....	17
3.2.Autres alternative : valorisation des ressources naturelles.....	18

Partie pratique

Chapitre III :Matériel et méthodes

1. Matériel végétal.....	19
1.1.Récolte des échantillons.....	19
1.2.Traitement des échantillons.....	19
2. Analyses physico-chimiques.....	20
2.1.Détermination du pH du jus de grenade.....	20
2.2.Détermination du Brix du jus de grenade.....	20
2.3.Détermination du taux d'humidité.....	21
2.4 . Détermination de l'acidité titrable du jus de grenade.....	21
3.Extraction et dosage des composés phénolique.....	21
3.1.Dosage des antioxydants.....	23
3.1.1.Dosage des composés phénoliques totaux.....	23
3.1.2.Dosage des flavonoïdes.....	23
3.1.3.Dosage des tannins condensés (proanthocyanidines).....	24
3.2.Détermination de l'activité antioxydants.....	24
3.2.1.Pouvoir réducteur.....	24
3.2.2.Activité antiradicalaire par DPPH.....	25
4. Elaboration d'une margarine avec de l'extrait d'écorces de grenade.....	25
➤ Mesure de stabilité oxydative des margarines élaborées.....	26
5. Détermination des propriétés physico-chimiques des margarines élaborées.....	27
5.1.Détermination du pH de la phase aqueuse.....	27
5.2.Détermination du taux d'humidité.....	27
5.3.Détermination de la teneur en sel.....	27
5.4. Détermination de l'indice de peroxyde.....	28
5.5. Détermination du point de fusion.....	28
5.6. Détermination de l'acidité et d'indice d'acide.....	28
5.7.Détermination du taux de solide par RMN.....	29
6. Analyses microbiologiques des margarines élaborées.....	29

Chapitre IV : Résultats et discussions

1. Paramètres physico-chimiques	32
1.1. pH du jus de grenade	32
1.3. L'acidité titrable du jus de grenade	33
2. Teneur en antioxydants dans les écorces de grenade	34
2.1. Les composés phénoliques totaux	34
2.2. Les flavonoïdes	34
2.3. Tannins condensés	34
3. Activités antioxydante et antiradicalaire	34
3.1. Pouvoir réducteur	34
3.2. Activité antiradicalaire sur le DPPH	35
4. Suivi de l'évolution de la stabilité oxydative des margarines élaborées	37
5. Margarine élaborées	37
5.1. Propriétés physico-chimique des margarines élaborées	37
5.2. Propriétés microbiologiques	40
Conclusion	41

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

La grenade (*Punicagranatum*) est un fruit antique avec des antécédents médicaux. Sa peau épaisse, de même que ses cloisons internes sont riches en tanins ce qu'il lui confère un goût âcres et amères. Les études ont montré que les antioxydants trouvés dans la grenade ont des effets bénéfiques sur la santé cardiovasculaire semblable aux effets du vin rouge (*vitisvinifera*) et du thé vert (*sinensis camélia*)(**Rosenblat et al., 2006**).

Des infusions à base d'écorce de grenade sont utilisées pour soigner les dysenteries (les tanins ont un effet astringent sur la muqueuse intestinale), et ce remède a été longtemps préconisé dans la thérapeutique traditionnelle. L'écorce et la racine du grenadier possèdent des propriétés vermifuges (**Rosenblat et al., 2006**).

L'isolement et la caractérisation de ces composés bioactifs constituent un sujet de recherche très actuel. De nombreuses études explorent aujourd'hui la possibilité de leur transformation en additifs dans différents produits alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques (**khan, 2010**).

L'oxydation est un phénomène largement répandu aussi bien dans le domaine alimentaire (oxydation des lipides) que physiologique (stress oxydant). Parmi ces produits la margarine qui représente un exemple typique car 82% de sa composition est constituée de matière grasse : première cible de l'oxydation (**Karleskind, 1992**). En effet, l'oxydation des lipides est une cause majeure de dégradation de la margarine lors de sa fabrication et de sa conservation. La conséquence la plus perceptible de celle-ci est l'apparition d'odeurs désagréables. Ces odeurs conduisent souvent au rejet du produit par le consommateur (**Prior, 2003**).

Pour lutter contre l'oxydation de la margarine, la société des corps gras de Béjaia « CO.G.B LaBelle », utilise des antioxydants d'origine synthétiques telle que la -tocophérol (vit E) qui est le plus employé. La tendance, aujourd'hui étant d'utiliser des substances d'origine naturelle qui jouerait le même rôle sans modifier les propriétés du produit. L'une des approches la plus appropriée consiste en l'exploitation d'extraits de déchets alimentaires ; c'est dans ce cadre que s'inscrit ce présent travail et dont l'objet d'étude est l'écorce de grenade. L'étude vise à substituer le Tocoblend par l'extrait d'écorce dans la margarine de table et vérifier si cet extrait possède des propriétés antioxydants permettant de favoriser la résistance de la margarine élaborée à l'oxydation, sans modifier ses caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques.

Partie
théorique

Chapitre I

1. Généralités

1.1. Origine géographique

La grenade (*Punicagranatum L.*), en latins Pomus et Granatus, ce qui signifie une tête de série ou de pomme granulaire, originaire de l'Iran à l'Himalaya dans le nord de l'Inde, où elle a été cultivée depuis des milliers d'années. Il y a plus de 1000 cultivars de *Punicagranatum*, qui sont passés de l'Iran, à l'est en Chine et en Inde et à l'ouest par la région Méditerranéenne, sur le sud-ouest américain, la Californie et le Mexique (Levin, 1994 ; Lansky et Newman, 2007).

La grenade est globalement cultivée dans de nombreuses régions géographiques, en répondant aux besoins nutritionnels et médicinaux des populations des différents pays comme l'Iran, l'Inde, l'Égypte, la Chine, Israël, la Tunisie, la Syrie, le Liban, la Turquie, la Grèce, Chypre, l'Italie, la France, l'Espagne, le Chili, le Portugal, les États-Unis, Oman et plus récemment en Afrique du Sud (Al-Said et al., 2009; Holland et al., 2009 ; Fawole et al., 2011).

1.2. Description botanique

La grenade est le fruit d'un arbuste appelé grenadier, de nom latin *Punicagranatum L.* appartenant à la famille des Punicacées (Espiard, 2002).

Il s'agit d'une baie ronde, cor-tiquée, c'est-à-dire à épicarpe cutinées et dur, de la taille d'une pomme ou d'une orange, de 2 à 12 cm de diamètre. Elle est surmontée des restes du calice, formant une couronne dentée, qui la rend facilement identifiable. Son péricarpe, coriace et épais, est non comestible. Il forme une écorce dure appelée *Malicorium*, de couleur blanc jaunâtre, ou jaune foncé marbré de rouge ou encore violet très foncé et d'un beau jaune à l'intérieur du fruit avec une saveur amère et astringente renferme de nombreuses graines contenues dans des loges, séparées par des cloisons ténues et membraneuses. Toutes ces graines possèdent un mésocarpe charnuet gélatineux, acidulé et sucré, représentant la partie comestible du fruit (Elodie, 2009), photographie de la grenade illustrée dans la figure 1 et la classification botanique de la grenade illustrée dans (le tableau I).



Figure 1 : Photographie de la grenade (*Punicagranatum L.*)(Anonyme 1, 2016).

Tableau I :Classification botanique de la grenade (*Punicagranatum L.*)(Mohamed Amine, 2012).

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Myrtale
Famille	Punicaceae
Genre	Punica
Espère	<i>P. granatum</i>

1.3.Composition des écorces de grenade

La concentration en macronutriments des écorces de grenades varie en fonction de plusieurs facteurs (variétés, climat, nature du sol, etc.) ; elle est moins importante que celle rapportée pour le fruit.

Selon **Mirdehghan et Rahemi, (2006)** la teneur en K> N>Ca>P>Mg>Na, mis à part le calcium qui est plus abondant dans les écorces ainsi que le sodium qui lui a une teneur équivalente. Pour ce qui est des micronutriments présents dans les écorces de grenade, les teneurs sont équivalentes à celle du fruit et qui sont représentés par le Bore qui représente la plus grande concentration (environ 22,2mg/kg), suivis du Fe (14,5mg/kg). Les minimales concentrations sont notées pour le Zn, le Cu et le Mn (11,75, 8 et 6 mg/kg respectivement).

1.4. Composition chimique du fruit de la grenade

La composition chimique des fruits de la grenade est donnée dans le tableau II.

Tableau II : Composition chimique du fruit de la grenade (Elodie,2009).

Partie du fruit	Composition
<p>La peau de la grenade (<i>Malicorium</i>)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Acides hydroxybenzoïques : l'acide gallique et l'acide ellagique, ○ Acides hydroxycinnamiques, ○ Dérivés de flavones : molécules de coloration jaune, ○ Anthocyanidines : responsables de la couleur rouge des grenades, ○ Nombreux ellagitanins : tels que la punicaline, la punicalagine, la corilagine, la granatine A et la granatine B, <p>Ces tanins représentent jusqu'à 28% de la peau du fruit,</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ La pelletierine pourrait aussi se trouver dans la peau de la grenade,
<p>Le jus de grenade</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Sucres : tels que le glucose, le fructose et le saccharose, ○ Acides organiques : l'acide citrique, l'acide ascorbique, l'acide gallique et l'acide ellagique, ○ Acides aminés : la valine, proline et méthionine, ○ Flavanols et indole-amines : la tryptamine, la sérotonine, ○ Anthocyanines : puissantes molécules antioxydants, fournissant au jus de grenade sa couleur rouge, augmente jusqu'à maturité du fruit, et diminue après la pression du fruit.
<p>Les graines</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ Huile : qui se compose : <ul style="list-style-type: none"> - Acides gras insaturés (80%) : l'acide punicoïque, les acides oléiques et linoléiques et d'autres acides, - Acides gras saturés : les acides palmitique et stéarique, ○ Hormones stéroïdiennes, Nombreux stérols : le cholestérol.

▪ Valeurs nutritives

La grenade fournit en moyenne 68 kcalories(285 kjoules) pour 100 g de partie comestible, ce qui la situe au niveau de la figue fraîche ou de la mangue. Cette énergie est fournie surtout par les glucides constitués en proportions sensiblement égales par du fructose et du glucose (le saccharose n'est présent qu'en très faibles quantités), protéines, lipides (acides gras, essentiellement les triglycérides (88%), diacylglycérols (7%) et les phospholipides (3%), acide punique (65%), acide linoléique (7%), par contre les fibres sont constituées presque en totalité par les fibres insolubles formant le tégument des graines alors que dans la pulpe débarrassée des graines et sa caractéristique juteuse vient de son importante teneur en eau (Tableau III)(USDA, 2006).

Tableau III : Valeurs nutritives de la grenade (USDA, 2006).

Nutriments	Valeur par 100g
Eau	80,97 g
Calories	68Kcal (285 Kj)
Protéines	0,95g
Lipides totaux	0,30g
Glucides totaux	17,1 g
Fibres	0,6 g

1.5.Composés phénoliques de la grenade

Les fruits de la grenade sont une source de divers composés biologiquement actifs, tels que les composés phénoliques comme punicalagin, acide ellagique, gallotannins, anthocyanines, qui sont connus pour agir en tant qu'antioxydants (Kkaplanet *al.*,2001 ; Nodaet *al.*, 2002 ; Cerdaetal.,2003)

- **Polyphénols**

Les polyphénols constituent un des groupes les plus communs et largement répandus dans les plants. Ils sont considérés comme des métabolites secondaires et ils n'ont pas de fonction métabolique spécifique dans les cellules végétales. Plus de mille polyphénols sont connus, ce sont des composés contenant un cycle aromatique avec un ou plusieurs groupes hydroxyles, ils peuvent être divisés en 15 grandes classes selon leurs structures chimiques. Certaines de ces classes sont des composés avec C6 aromatique, d'autres avec la structure C6-C1, et d'autres avec des squelettes plus complexes (**Bennick, 2002**).

Ce sont des constituants importants à propriétés organoleptiques des graines et des jus de grenade car ils donnent la couleur rouge attrayante et fournissent l'astringence douce qui est caractéristique de la saveur de la grenade (**Gil et al., 2000**).

Les polyphénols prédominants sont les flavonoïdes, les tannins condensés et les tannins hydrolysables (**Gil et al., 2000 ; Van Elswijk et al., 2004 ; Seeram et al., 2006**)

a). Tannins

Les tannins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbres et des fruits (raisin, datte, café, cacao...). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation (**Hemingway, 1992**).

Les tannins confèrent un goût amer au jus de la grenade et aux membranes blanches qui entourent les graines. Il a été rapporté que la grenade possède deux tannins à savoir l'aide ellagique et punicalaagin qui ont un rôle important dans l'activité antioxydante (**Arjamand, 2011**).

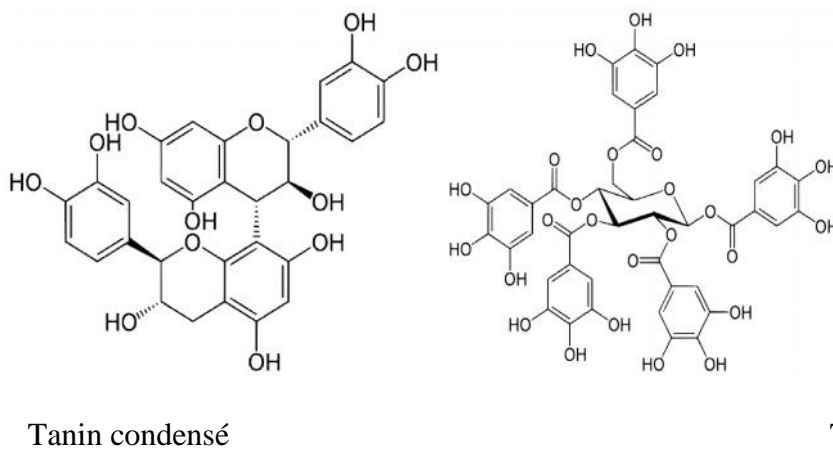
a.1). Tannins hydrolysables

Les tannins hydrolysables sont des esters de glucides ou d'acides phénols, ou de dérivés d'acides phénols ; les molécules glucidiques est en général du glucose, mais dans certains cas des polysaccharides (**Ribereau, 1968**).

L'intérêt des tannins hydrolysables de grenade dans divers domaines scientifiques et commerciaux a augmenté constamment vu leur intérêt de a le secteur alimentaire, car ces composés jouent un rôle important dans la qualité des aliments grâce à leur propriétés antioxydantes (**Arapitsas, 2012**).

a.2). Tannins condensés

Les tannins condensés sont trouvés dans la peau et le jus (Arjamand, 2011). La plupart des activités des tannins condensés dépendant en grande partie de leur structure, en particulier leur degré de polymérisation (Arapitsas, 2012).



Tanin condensé

Tanin hydrolysable

Figure 2: Structure chimiques d'un tanin hydrolysable et d'un tanin condensé (Kumbasli, 2005 ; Peronny, 2005).

b). Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des polyphénols naturels et complexes, présents sous forme de dérivées glucosidiques dans de nombreux fruits et légumes (Alaiset *al.*, 2003).

Les flavonoïdes sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles. Ils sont des présents dans les cellules épidermiques de feuilles et ils sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs des rayonnements UV (Hadi, 2004).

Il a été signalé que la grenade présente des principaux flavonoïdes à savoir la catéchine quercitrine, et le kœmpferia, qui jouent un rôle important dans l'activité antioxydant (Arjamand, 2011).

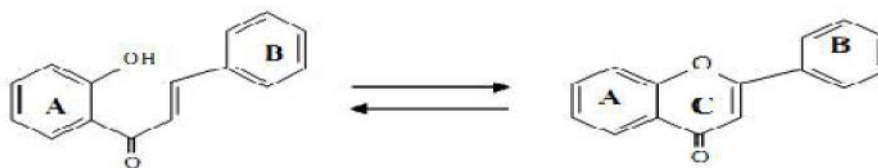


Figure 3 : Structure de base d'un flavonoïde (Heller et Forkmann., 1993).

c). Anthocyanines

Ce sont des pigments vacuolaires rouges, roses, mauves, pourpres, bleus ou violets de laplupart des fleurs et des fruits (Bruneton, 1993). Ils sont caractérisés par l'engagement de l'hydroxyle en position 3 dans une liaison hétérosidique (les anthocyanosides). Leurs génines (les anthocyanidols) sont des dérivés du cation 2-phényl-benzopyrylium plus communément appelé cation flavylum. Ces pigments représentent des signaux visuels qui attirent les animaux pollinisateurs (insectes, oiseaux) (Brouillard *et al.*, 1997 *in* Bahorum, 1997).

La composition en anthocyanines est un paramétré important de qualité du fruit de la grenade, en raison de l'importance de ces derniers dans la couleur des jus respectifs. Les anthocyanines dans la grenade changent considérablement avec les cultivars, maturité, le secteur de production et conditions saisonnières (Gil *et al.*, 1995 ; Borochoy-Neoriet *al.*, 2009).

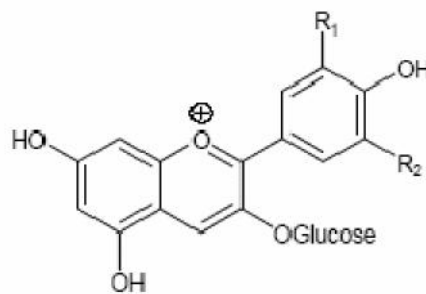


Figure 4 : Structure des anthocyanosides.

1.6. Usages de la grenade

Toutes les parties de l'arbre ont été utilisées dans divers usages, comme sources de tannin pour traiter le cuir, L'écorce du tronc en contient 10 à 25%. L'écorce des racines 28%, les feuilles 11%, et l'écorce du fruit pas moins de 26%. L'encre peut être faite en trempant les feuilles dans du vinaigre. Au Japon, un insecticide est dérivé de l'écorce (Morton, 1987).

➤ Utilisation culinaire et médicale

En plus du fruit frais, on trouve sur le marché du jus de grenade (ou du concentré), un sirop appelé « grenadine » et un autre, beaucoup plus épais, moins sucré et plus acidulé qui porte le nom de « mélasse de grenade ».

Il sert a aromatisé divers produits tel que: boissons lactées, gazeuses ou alcoolisées, limonades, desserts. Enfin, on trouve également des arilles séchés, entiers ou en poudre, qui

sont largement utilisés dans la cuisine indienne, et divers produits de spécialité (vinaigre et vin de grenade, sauces, etc.)(**Vanier, 2005**).

L'utilisation médicale de la grenade remonte à plus de 3 000 ans; le fruit non mûr et son écorce ont été donnés comme astringents à la diarrhée, à la dysenterie et halte aux hémorragies. Des bourgeons secs et pulvérisés de fleur sont utilisés comme remède pour la bronchite.

Au Mexique, une décoction des fleurs est utilisée pour soulager l'inflammation oral et de la gorge. Les huiles essentielles des graines favorisent la régénération de l'épiderme. Les feuilles, les graines, les racines et l'écorce ont montré une activité hypotendue, antispasmodique dans l'essai biologique. Comme contre-indication; chez les femmes enceintes, la peau séchée de grenade produit des glaires, l'utilisation d'une dose de 5g maximum du fruit séché, broyé, en poudre, en décoction peut être légèrement toxique (**Morton, 1987**).

Chapitre II

1. Généralités sur la margarine

1.1. Historique

La margarine a été inventée en 1869 par Mege-Mourises, pharmacien français, à la suite d'un concours organisé par Napoléon III, « pour un corps gras semblable au beurre mais de prix inférieur, apte à se conserver longtemps en gardant sa valeur nutritive » (**Trémolieres, 1980**).

1.2. Définition

Le terme « margarine » désigne les produits se présentant sous forme d'une émulsion solide ou fluide et malléable, principalement du type eau dans la matière grasse, dérivés de matières grasses végétales et/ou animales, solides et/ou liquides propres à la consommation humaine dont la teneur en matières grasses d'origine laitière n'excède pas 3% de la teneur en matières grasses (**Aboke et al., 2008**).

Elle contient aussi des additifs (lécithine, sel, colorant, antioxydants, vitamines, etc.) répartis en partie dans la phase grasse et en partie dans la phase aqueuse (**Karleskind, 1992**).

1.3. Composition globale des margarines

C'est une émulsion stabilisée par des additifs (lécithines par exemple) et obtenue par un mélange de deux phases bien distinctes (**Fredot, 2005**) :

Une phase grasse : elle représente au moins 80% du produit final et est principalement constituée de matières grasses pouvant être d'origine animale (saindoux, huiles de poissons hydrogénées) ou végétale (huiles d'arachide, de colza, de maïs, de coprah, de palme, etc.). Cette phase comporte également des additifs liposolubles tels des émulsifiants, éventuellement complétés par des colorants, des arômes et des vitamines (**Fredot, 2005**) ;

Une phase aqueuse : dont la teneur ne doit dépasser les 16% du produit final. Cette phase contient, outre l'eau, des composants hydrosolubles comme du lait, de l'acide citrique, du sel ou éventuellement du sorbate de potassium (**Fredot, 2005**).

1.4. Fabrication des margarines

La fabrication de la margarine selon **Karleskind, (1992)** comprend plusieurs étapes successives (**Figure 5**).

- **Préparation de la phase grasse** : avec des huiles, des corps gras végétaux raffinés, en l'état, fractionnés, interestérifiés ou hydrogénés, auxquels peuvent être incorporés certains additifs (émulsifiants, colorants) et des substances à but nutritionnels (vitamines liposolubles) ;
- **Préparation de la phase aqueuse** : avec de l'eau et/ou des coproduits de l'industrie laitière (lait écrémé, lactosérum en poudre, babeurre), auxquels peuvent être incorporés des ingrédients protéiques, du sel, des arômes ;
- **Préparation de l'émulsion** : par mélange des deux phases. La phase aqueuse sera incluse dans la phase lipidique. La durée d'agitation détermine la finesse des bulles. Cette émulsion est stabilisée par les émulsifiants qui se placent à l'interface eau/huile, et maintiennent la structure grâce à leur caractère amphiphile ;
- **Cristallisation** : par refroidissement ;
- **Texturation** : par malaxage, afin d'obtenir la consistance voulue et une meilleure homogénéité ;
- **Conditionnement** : en barquettes ou en plaques.

1.5. Classification des margarines

1.5.1. Margarines à destination des professionnels

Ces margarines présentent dans leur phase grasse une proportion d'huiles concrètes plus importante, cela pour répondre à la fois aux besoins de fonctionnalité imposés par les contraintes de travail des différentes applications (laminage, incorporation, etc.) mais aussi aux qualités organoleptiques attendues (stabilité à l'oxydation, texture croustillant, croquant, fondant, etc.). Elles sont incorporées dans les produits alimentaires élaborés comme les produits de boulangerie, pâtisserie, viennoiseries, gâteaux, biscuits, etc. (**Saillard, 2010**).

1.5.2. Margarines de tables traditionnelles

Tout comme les précédentes, leur phase grasse présente une forte proportion d'huiles concrètes. Leur taux d'acides gras saturés (AGS) est plus élevé, il joue un rôle dans la texture et permet une présentation en plaquette ou en barquette. En moyenne, le taux de matière

grasse varie entre 55 et 80% de la masse totale. Elles peuvent être utilisées en cuisson ou comme ingrédients dans une recette (Saillard, 2010).

1.5.3. Margarines de table allégées et « santé »

Ces margarines ont une teneur en matière grasse totale de 60%, 41% ou 27%. Elles sont réalisées à partir d'huiles riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) et d'une fraction d'huile de palme et sont généralement enrichies en vitamines (A, D et E) (Desalme *et al.*, 2004).

1.5.4. Margarines de table riches en acides gras insaturés

La plupart des margarines sont naturellement riches en AGI grâce aux huiles végétales entrant dans leur composition. La nature des huiles utilisées permet de faire varier les teneurs en AG et d'obtenir une richesse en vitamine E.

Les margarines de table riches en AGI et celles dites allégées peuvent être utilisées pour un usage « tartine » et/ou « cuisson », l'emploi tartine étant privilégié du fait de la faible teneur en matières grasses solides des produits (Saillard, 2010).

1.5.5. Margarines de tables enrichies en stérols végétaux

Ces margarines sont enrichies en stérols végétaux (phytostérols ou phytostanols) dont le mode d'action particulier conduit à une baisse du taux de cholestérol. Elles sont destinées aux personnes dont le taux de cholestérol est trop élevé et peuvent être utilisées en tartine ou en cuisson selon les spécifications du fabricant (Saillard, 2010).

1.6. Altération de la margarine

Les facteurs d'altération de la margarine peuvent être d'ordres physique, chimique et bactériologique. La margarine, étant formée d'un pourcentage élevé de matières grasses, est exposée à l'oxydation. Cette dernière est à l'origine de l'odeur de rance et est liée à :

- la lumière ;
- la température élevée et la durée de stockage ;
- la présence des germes lipolytiques ;
- le taux d'insaturation que contient la phase grasse ;
- l'exposition de la margarine à l'oxygène atmosphérique.

L'altération physique est due à la modification de la consistance de la margarine qui, à son tour, est due au phénomène de recristallisation (post-durcissement). La formation de ces

cristaux entraîne la réduction de la phase liquide par rapport à la phase solide et conduit en général à la perte de la texture, de la flaveur et de l'apparence recherchée (Genot *et al.*, 2003).

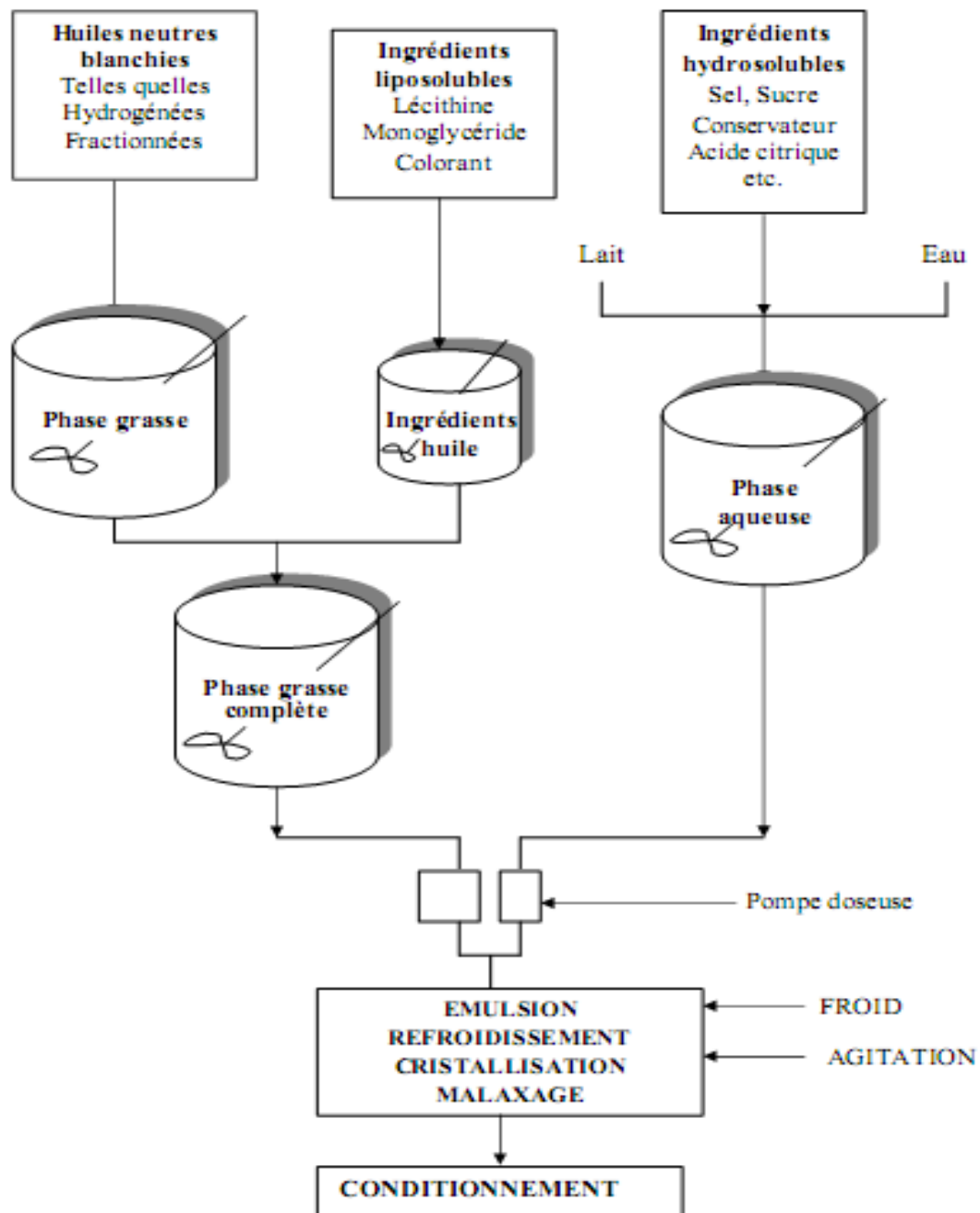


Figure 5 : Schéma général de fabrication de la margarine (Karleskind, 1992).

2. Oxydation et antioxydants

2.1. Oxydation

L'oxydation des lipides a été reconnue comme un problème majeur affectant les huiles comestibles et les matières grasses. Elle provoque une altération de leurs qualités nutritionnelles, sensorielles ainsi leurs propriétés chimiques (Cillard et Cillard, 2006; Villiere et Genot, 2006; Kim *et al.*, 2007). Le développement de ce phénomène, peut avoir lieu pendant les traitements technologiques, culinaires ou au cours de la conservation (Villiere et Genot, 2006).

L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydoréduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux libres qui entraînent des réactions en chaîne destructrice (Herberg *et al.*, 2004).

2.1.1. Types d'oxydation et leurs mécanismes

Il existe plusieurs types d'oxydation qui mettent en oeuvre des mécanismes réactionnels très différents en fonction des agents initiateurs (Villiere et Genot, 2006 ; Rahmani, 2007).

➤ Auto-oxydation

L'auto-oxydation correspond à une fixation de l'oxygène sur des molécules insaturées. Les composés les plus exposés à cette oxydation sont les acides gras insaturés mais elle peut aussi dégrader d'autres constituants tels que les tocophérols et les pigments liposolubles (Laguerre, 2007).

L'auto-oxydation est un enchainement de réactions radicalaires qui se déroulent en 3 étapes (Blithoven, 2006). Les réactions d'auto-oxydation sont représentées en (Figure 6).

➤ Oxydation des lipides par oxygène singulet (photo-oxydation)

L'activation de l'oxygène moléculaire en oxygène singulet s'effectue soit par perte d'un électron de l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$ obtenu après interaction de l'oxygène triplet avec un agent métallique, soit par photo-oxydation de l'oxygène triplet en présence d'un photo sensibilisateur (chlorophylles, phéophytines, métalloporphyrine ou les riboflavines) (Jeantet *et al.*, 2006).

➤ Oxydation enzymatique

Le phénomène d'oxydation des AGI peut être d'origine enzymatique et l'enzymatique et l'enzyme généralement impliquée est lipoxygénase (Eymard, 2003 ; Pokorny, 2003).

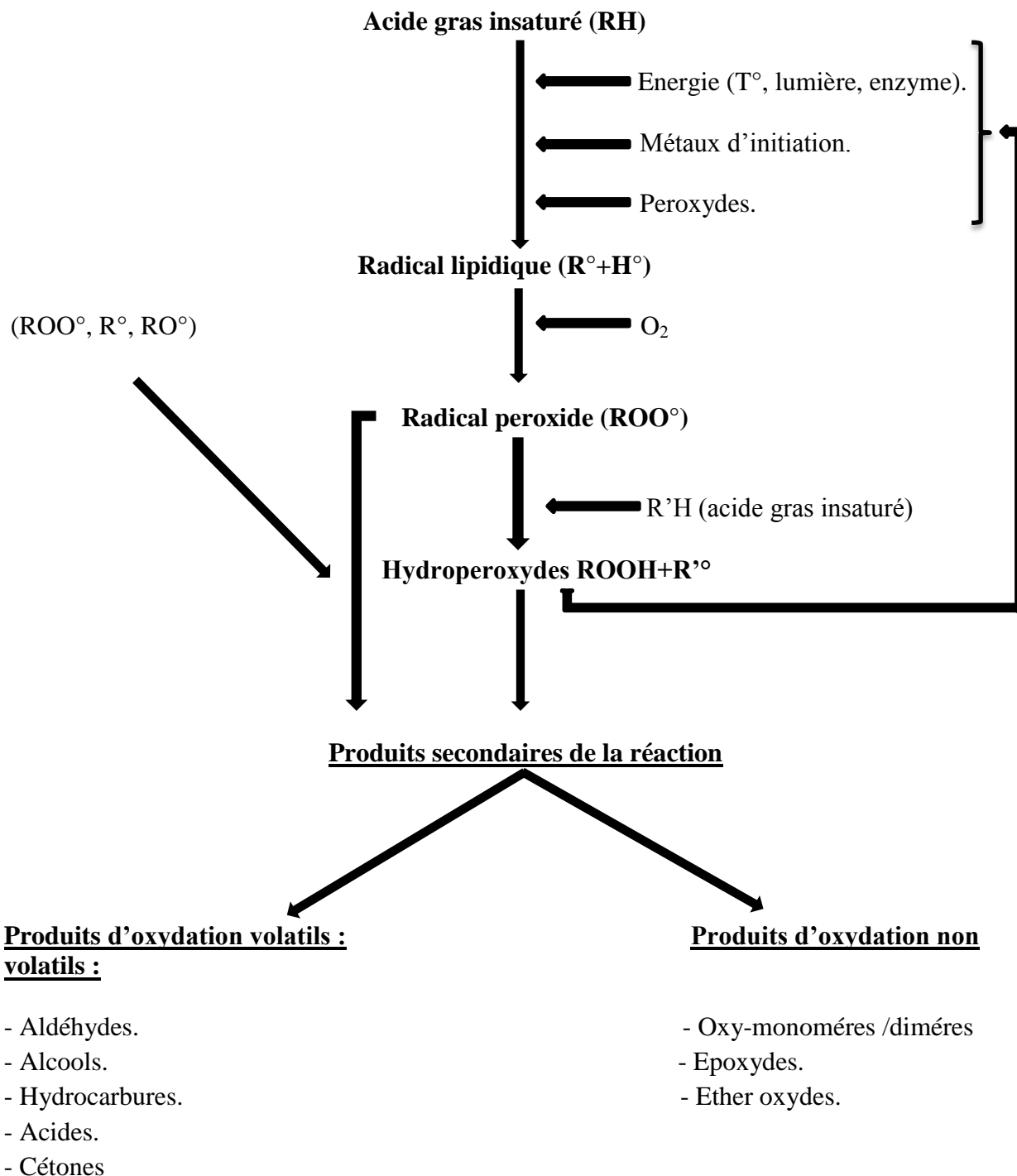


Figure 6 : Schéma général de l'oxydation des lipides (Eymard, 2003).

Le mécanisme d'oxydation des acides gras insaturés par la lipoxygénase est montré en (Figure 7).

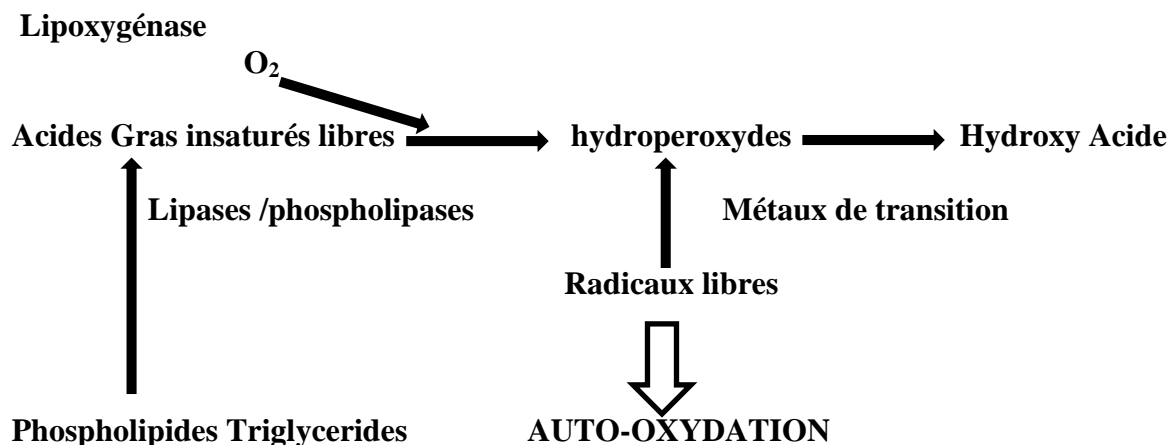


Figure 7 : Mécanisme d'initiation de la peroxydation des lipides par l'activité lipoxygénasique d'après **German et Kinsella (1985)**.

2.1.2. Impact de l'oxydation des corps gras

L'impact de l'oxydation des corps gras est triple :

➤ Impact nutritionnel et organoleptique

Dégradation des vitamines liposolubles et des acides gras essentiels ; développement de saveurs anormales, changement de couleur (**Zidani, 2009**).

➤ Impact Sanitaire

Les composés secondaires d'oxydation montrent des effets cytotoxiques et mutagènes (cas du malondialdéhyde, par exemple, qui réagit avec l'ADN) ou encore des effets cancérigènes, mutagènes et athérogènes (cas des monomères cycliques et oxystérols) (**Rahmani, 2007**).

➤ Impact économique

Perte de la valeur marchande suite à l'oxydation qui déprécie la qualité du produit (**Rahmani, 2007**).

3. Moyens de lutte contre l'oxydation des lipides

Les répercussions économiques peuvent être importantes car les données alimentaires deviennent inconsommables. Il suffit de très faibles doses de matières grasses oxydées (de l'ordre de 1%) pour rendre un aliment impropre à la consommation car le goût de rance

apparaît nettement. D'où l'intérêt des industriels d'avoir recours à des antioxydants tels que la vitamine E pour limiter ces phénomènes.

3.1. Les antioxydants synthétiques : La vitamine E

a) Définition

Les tocophérols est un nom proposé pour la première fois en 1936 par Evans et collaborateurs, ce sont des composés liposolubles regroupés sous le terme vitamine E. Selon **Pennock *et al.* (1964)** la vitamine E regroupe quatre substances, β -tocophérol, γ -tocophérol, δ -tocophérol, α -tocophérol qui est la seule forme reconnue pour répondre aux besoins humains (**figure 8**).

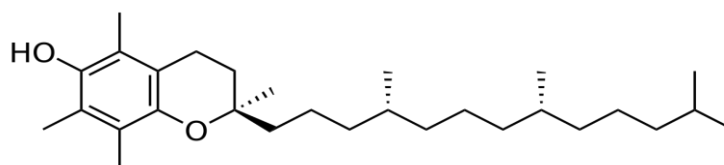


Figure 8 : Structure de l' α -tocophérol (**Ju, 2012**).

La vitamine E est reconnue comme antioxydant, grâce à sa capacité à inhiber les peroxydations lipidiques (**Cheeseman et Slater, 1993**). A cet égard, elle participe avec de nombreuses autres substances, à la lutte contre les formes réactives de l'oxygène (FROs).

b) Propriétés physico-chimiques

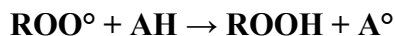
Les tocophérols présentent, à la température ambiante, sous la forme d'une huile visqueuse de coloration jaune pâle. Ils insolubles dans l'eau, très solubles dans les graisses, les huiles et les solvants organiques.

La vitamine E existe également sous forme synthétique : il s'agit du dl-alpha-tocophérol que l'on retrouve dans les suppléments en vitamine E. On retrouve également l'acétate ou le succinate de tocophérol. Bien que la forme synthétique soit bénéfique, la forme naturelle est particulièrement recommandée. En effet, elle naturelle est la plus active (**Birlouez-aragon *et al.*, 1995**)

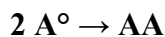
c) Rôle en industrie agro-alimentaire

Les constituants lipidiques des aliments ont tendance à s'oxydé au contact de l'air atmosphérique. Ce qui entraîne une altération de l'odeur, du goût et de couleur des denrées alimentaires.

La vitamine E stoppe l'oxydation des acides gras en s'oxydant à leur place. C'est la réaction qui nécessite le moins d'énergie qui se fera préférentiellement. La vitamine E intervient surtout au stade de l'initiation, en cédant un de ses atomes d'hydrogéné au radical peroxyde qui se stabilise et devient non réactif. Cela permet ainsi d'arrête les réactions enchaîné selon la réaction suivante (**Birlouez-aragon *et al.*, 1995**).



Le radical libre A° formé par la vitamine E (AH) se stabilise en s'associant avec d'autres molécules selon les réactions suivantes :



La vitamine E peut également intervenir au cours de la phase de propagation en absorbant préférentiellement l'oxygène.

d) Toxicité

La vitamine E est caractérisée par une très faible toxicité. Aucun cas de E hypervitaminose n'a été signalé. Des doses orales quotidiennes allant jusqu'à 100 mg sont considérées comme étant à l'intérieur de la normale gamme physiologique. Toutefois, les doses quotidiennes 200-1000 mg pendant plusieurs mois ne sont pas toxique pour les adultes. Dans certaines cas, des symptômes gastro-intestinaux tels que des nausées, des maux d'estomac, des vomissements et diarrhée ainsi que la fatigue et la dermatite ont été observées. Cependant, les effets mutagènes, tératogènes ou cancérigènes n'ont pas été rapportés (**Boucher *et al.*, 1998**).

3.2. Autres alternative : valorisation des ressources naturelles

La valorisation des ressources naturelles telle que des extraits végétaux et produits du métabolisme secondaire de la plante est notée d'un grand intérêt. En fait, des extraits de plants ont suscité un grand intérêt scientifique en raison de leur potentiel une source d'antioxydants naturels et composés biologiquement actifs, tels que des substances antibactériennes, antifongiques et insecticides (**Celiktas *et al.*, 2007**).

La richesse d'écorces de grenade en substances antioxydants naturelles lui donne l'avantage de faire appel à l'exploitation de ces déchets en tant qu'additifs alimentaires qui jouent le rôle comme conservateur.

Chapitre III

1. Matériel végétal

1.1 des échantillons

L'étude est réalisée sur une variété de grenade (*Punicagranatum L.*) appelée *Lahlou*, récoltée début septembre dans la région de Timezrit (Wilaya de Bejaia). Le tableau IV résume les principales caractéristiques de la variété de grenade étudiée.

Tableau IV : Caractéristiques de la variété de grenade *Lahlou*.

Variété Caractéristique	<i>Lahlou</i>
Couleur de l'écorce	Jaunâtre
Epaisseur de l'écorce	Epaisse
Poids	148,28 ± 37,23 g
Diamètre	5,88± 1,24 cm
Goût	Sucré
Graines	Grands de taille, couleur rouge ou rouge-rose, peu foncée, translucides

1.2 Traitement des échantillons

Les grenades sont transportées au laboratoire, lavées abondamment à l'eau afin d'éliminer toutes les impuretés puis séchées à température ambiante pendant environ 30 min. Les écorces sont séparées de la partie interne manuellement et délicatement qui est pressée pour récupérer le jus de grenade à travers d'une passoire ; celui-ci est conservé à basse température en attendant la détermination des paramètres physico-chimiques.

Les écorces obtenues sont séchées à température ambiante à l'obscurité pendant 4 jours. Les écorces séchées sont broyées à l'aide d'un broyeur électronique (PLANESAT, Chine) pour obtenir une poudre fine homogène. Cette dernière est conservée à -20°C.

La figure 9 illustre des images des différentes parties du fruit ainsi que de l'échantillon étudié.

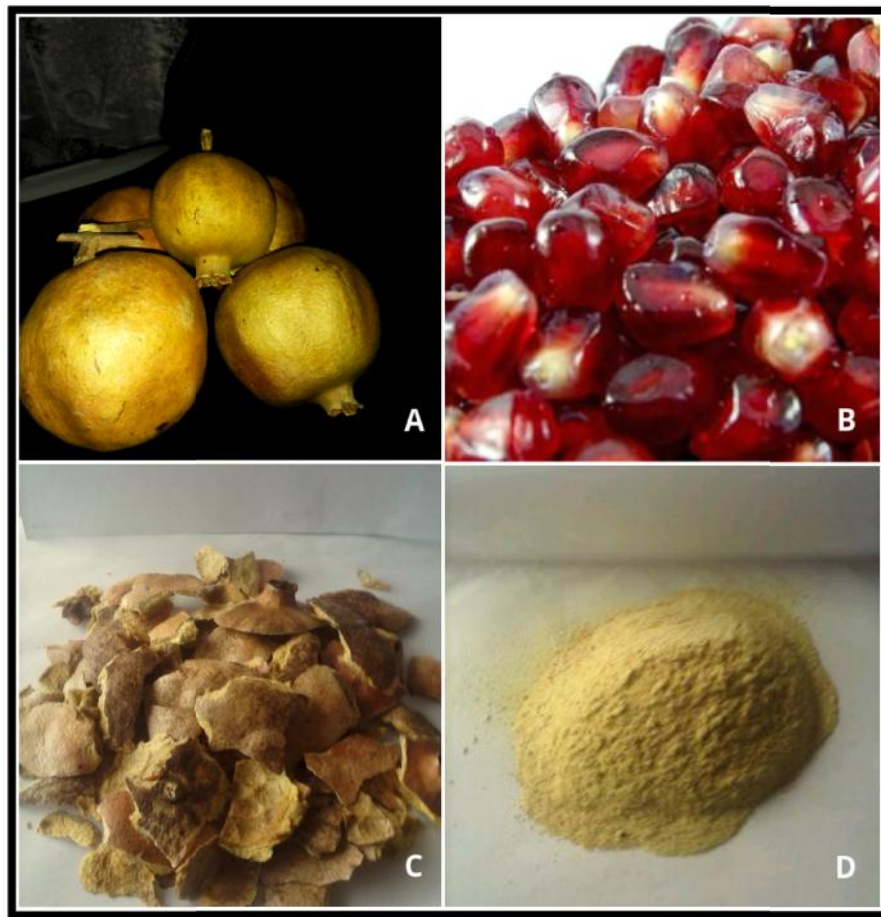


Figure 9 : Photographies de la grenade (A), de graines de grenade (B), de l'écorce de grenade séchée (C) et de la poudre d'écorces de grenade (D).

2. Analyses physico-chimiques

2.1. Détermination du pH du jus de grenade

Le pH de jus de grenade a été mesuré par un pH-mètre (HANNA instrument, pH209, Allemagne) après avoir été étalonné.

2.2 Détermination du Brix du jus de grenade

Après homogénéisation, quelques gouttes de jus de grenade sont versées sur le prisme de l'appareil ; celui-ci est ensuite tourné vers une source de lumière. La lecture est faite sur l'échelle l'oculaire, à l'intersection des zones claire et sombre.

2.3 Détermination du taux d'humidité

Elle consiste à sécher un poids déterminé de jus et de poudre d'écorces de grenade à 105°C jusqu'à la stabilité de poids. La teneur en humidité est déterminée par la formule suivante :

$$\text{Humidité (\%)} = \frac{P_f - P_s}{P_f} \times 100$$

Où :

P_f : poids frais de l'échantillon ;

P_s : poids sec de l'échantillon.

2.4 Détermination de l'acidité titrable du jus de grenade (AFNOR : V 05-101,1974)

L'acidité titrable représente la somme des acides minéraux et organiques présents dans le produit. Elle est exprimée en fonction de l'acide dominant. 1ml de jus de grenade est mélangé à 9 ml d'eau distillée puis titré avec une solution de soude (NaOH) à 0,1 N en présence d'un indicateur coloré (phénolphtaléine) jusqu'à obtention d'une coloration rose pâle persistante.

L'acidité titrable est exprimée en gramme d'acide citrique pour ml de produit (A g/ml) :

$$\text{Acidité en gramme d'acide citrique pour ml} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times 0,64}{A_{\text{ml}}}$$

Où :

V_{NaOH} : volume de NaOH versé en ml.

0.64 : coefficient correspondant à l'acide citrique.

3. Extraction et dosage des composés phénolique

Dans ce présent travail, les composés phénoliques contenus dans l'écorce de grenade, sont extraits par l'éthanol à 70%. La poudre d'écorces de grenade est additionnée à 100 ml du solvant et le mélange est incubé avec agitation à température ambiante pendant 1 h suivie d'une filtration à l'aide d'un papier filtre WATTMAN. Le filtrat obtenu est évaporé sous vide à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif (HEIDOLPH, Allemagne).

Précisons que l'extraction est répétée deux fois. Le premier extrait obtenu est reconstitué dans 10 ml de méthanol pur et conservé au congélateur à -20°C . L'extrait méthanolique obtenu servira pour le dosage des antioxydants et l'évaluation de leurs activités antioxydante et antiradicalaire.

Le second est reconstitué dans l'eau distillée (10 ml), congelé 24 h avant d'être lyophilisé, la poudre obtenue est conservée à -20°C . L'extrait lyophilisé obtenu servira à l'élaboration des margarines.

Le protocole d'extraction est illustré par la figure 10.

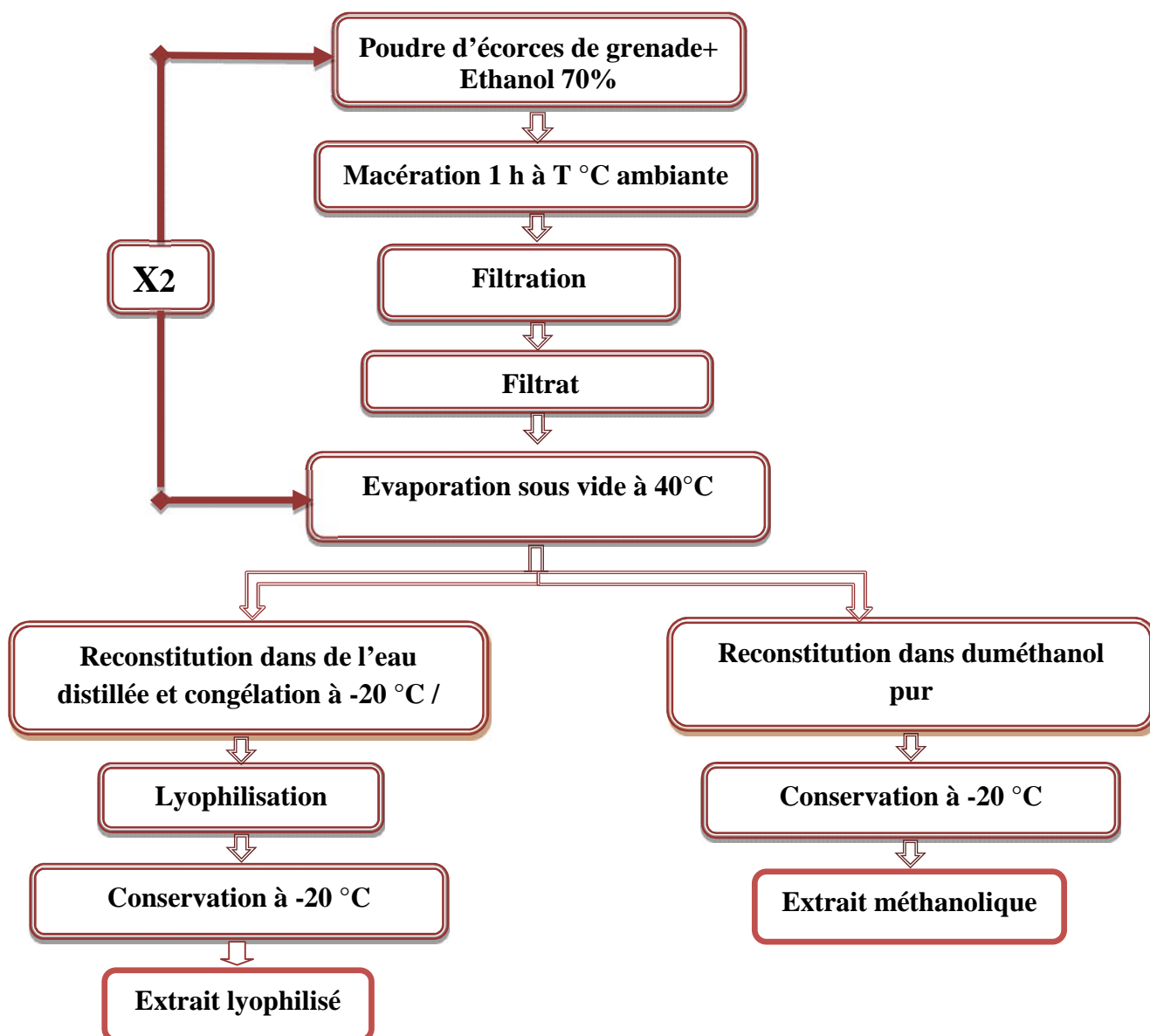


Figure 10: Protocole d'extraction des composés phénoliques de la poudre d'écorces de grenade

3.1 Dosage des antioxydants

3.1.1 Dosage des composés phénoliques totaux

La méthode colorimétrique utilisant le FolinCiocalteu est souvent adoptée pour le dosage des composés phénoliques totaux. Ce réactif est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdiques ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (**Ribereau, 1968**). L'intensité de la coloration produite, dont l'absorption maximum à 760 nm, est proportionnelle à la quantité totale des composés phénoliques présents dans les extraits (**Abdelhameed**).

La teneur en composés phénoliques totaux est déterminée par la méthode de **Velioglu et al. (1998)**. Un volume déterminé d'extrait est additionné de 1,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu. Après 3 min d'incubation à l'obscurité, 1,5 ml de carbonate de sodium (6%) sont ajoutés. Le mélange est agité puis incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant une 60 min. les absorbances sont lues à 760 nm contre un blanc.

La concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage d'acide gallique (Annexe II). Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par 100g de matière séché (mg EAG/100g MS).

3.1.2 Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes est basé sur chélation des ions d'aluminium par les antioxydants (**Ribereau-Gayon, 1968**). Le complexe formé se traduit par une couleur jaune dont l'intensité dépend de la concentration de ces derniers.

Le dosage des flavonoïdes est effectué selon la méthode de **Djeridane et al. (2006)**, avec quelques modifications ; 1,5 ml de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) à 2% sont additionnés à 1,5 ml d'extrait. Après 30 min d'incubation, les absorbances sont lues à 430 nm contre un blanc.

La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec de la quercitrine (Annexe II). Les résultats sont exprimés en mg équivalent quercitrine par 100g de matière sèche (mg EQ/100g MS).

3.1.3 Dosage des tannins condensés (proanthocyanidines)

En raison de la grande variation de leur structure, la mesure de la teneur en tannins condensés est complexe. Plusieurs méthodes de dosage ont été proposées. Cependant, la méthode colorimétrique mettant en jeu l'HCL-butanol est la souvent utilisés ; elle est basée sur l'oxydation des tanins en milieu acide (**Porte et al.,1986 ; Terrillet al., 1992**).

La méthode basée sur le dosage de butanol/HCL décrit par **vermirris et Nicholson (2006)** est suivie; 250 µl de l'extrait sont additionné à 2,5 ml d'une solution acide de sulfate ferreux [15,40 mg de sulfate ferrique d'ammonium : Fe₂(SO₄)₃ dissous en 100 ml de (3:2 n-butanol: HCL)].Après mélange et incubation à 95°C pendant 50 min, les absorbances sont lues à 530 nm contre blanc.

La concentration des tannins condensés est déduite par la relation suivante :

$$C \left(\frac{mg}{g} \right) = \frac{(Abs \times PM \times FD)}{(L \times \epsilon)}$$

Où :

C : Concertation des tannins exprimée en mg/g d'échantillon ;

Abs : Absorbance de solution ;

PM : Poids moléculaire de cayanidine(287,24 g/mol) ;

FD : Facteur de dilution ;

L : longueur de la cuve (1cm) ;

ε : Facteur d'absorbance molaire de Cyanidines (34700 L/mol.cm).

3.2 Détermination de l'activité antioxydants

3.2.1 Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur est la capacité d'un extrait à réduire le fer. De nombreux auteurs considèrent la capacité réductrice d'un composé comme indicateur significatif de son pouvoir antioxydants (**Li et al., 2005 ; Verzelloniet al., 2007 ; Liu et al., 2008**).

Le pouvoir réducteur des extraits d'écorces de grenade est déterminé selon la méthode d'**Oyaizu (1986)**. Un volume déterminé d'extrait d'écorce de grenadeest mélangé avec 1,25 ml de tampon phosphate (0,2 M, PH 6,6), à 1,25 ml de ferricyanure de potassium (1%). Le

mélange est incubé à 50°C pendant 20min puis 1,25 ml d'acide trichloracétique (10%) sont ajoutés. A partir de ce mélange, 1,25 ml sont prélevés puis additionnés de 1,25 ml d'eau distillée et de 0,25 ml de chlorure ferrique (0,1%). Les absorbances sont lues à 700 nm contre un essai à blanc.

Cette activité est réalisée à différents concentrations de l'extrait. Afin de situer l'efficacité de l'extrait, deux standards (quercetine et BHA), souvent utilisés dans l'industrie agroalimentaire, sont préparés en parallèle à différentes concentrations (0,04-0,16 et 0,4-0,1mg/ml respectivement).

3.2.2 Activité antiradicalaire par DPPH

Le radical DPPH est largement employé comme substrat pour évaluer l'activité antioxydants. La réduction de ce radical est déterminée par la diminution de son absorbances à 517nm induite par des antioxydants naturels ou de synthèse (Molyneux, 2004 ; Marxenetal.,2007).

L'activité du radical DPPH est déterminée selon le protocole décrit par Lopeslutz et al. (2008) ; un volume d'extrait est ajouté 2,44ml de la solution DPPH. Après agitation, les échantillons sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 60 min. Les absorbances sont lues à 515nm.

Le pourcentage d'inhibition (PI) du radical libre est calculé comme suite :

$$PI = \frac{Ac - Ae}{Ac} \times 100$$

Où :

Ac : absorbance du contrôle ; **Ae** : absorbance de l'extrait.

A titre de comparaison, deux standards (quercetine et BHA) sont testés à différentes concentrations (0,04-0,2 mg/ml).

4. Elaboration d'une margarine avec de l'extrait d'écorces de grenade

Pour déterminer la concentration nécessaire à être incorporée dans la margarine, trois concentrations de l'extrait de l'écorce de grenadesont testées (x, y et zppm). Une margarine est produite manuellement à l'échelle laboratoire (Annexe III); les deux phases liquide et grasse sont préparées séparément dans deux béchers. L'extrait est incorporé dans la phase

liquide. Après dosage des deux phases, l'émulsion passe par une agitation et un refroidissement avec de l'eau glacée avant d'être réparti 1 kg dans des barquettes de 250 g. Une margarine témoin élaborée avec de la vitamine E est, également, préparée en parallèle. Les margarines préparées comme suit :

ME1: 1Kg (4 Barquettes): avec l'extrait d'écorces de grenade à 50ppm.

ME2 : 1Kg (4 Barquettes): avec l'extrait d'écorces de grenade à 100ppm.

ME3: 1Kg (4 Barquettes): avec l'extrait d'écorces de grenade à 150ppm.

ME4: 1Kg (4 Barquettes): avec vitamine E (témoin) à 100 ppm.

Tableau V : Les ingrédients des margarines élaborées

	Margarine témoin avec de la Vitamine E (ME1)	Margarine avec l'extrait d'écorces de grenade (ME2)
Blend	Huile de palme, tournesol, équivalent de soja hydrogéné	
Phase grasse	100ppm	Xppm (phase aqueuse)
	-Caroténe	
	Arome (diacétyle)	
	Emulsifiant	
Phase aqueuse	L'eau	
	Lait	
	Sel	
	Acide lactique	
	Sorbate de potassium	

Les barquettes obtenues sont stockées à 4°C.

-Mesure de stabilité oxydative des margarines élaborées

Afin d'évaluer la sensibilité des margarines élaborées vis-à-vis a l'oxydation, nous avons suivi l'évolution des paramètres physico-chimiques et microbiologiques pour une période de 90 jours. La margarine étant conservée au frais (4°C).

5. Détermination des propriétés physico-chimiques des margarines élaborées

5.1 Détermination du pH de la phase aqueuse

Le pH est déterminé directement sur la phase aqueuse à l'aide d'un pH-mètre, après séparation des deux phases (grasse et aqueuse) (Wolff, 1968).

5.2 Détermination du taux d'humidité (ISO, 1998)

Ce test permet de déterminer la teneur en eau dans la margarine. Elle consiste d'abord à chauffer l'échantillon (2 g) sur une plaque chauffante, en agitant soigneusement jusqu'à évaporation totale de l'eau, puis à laisser refroidir dans un dessiccateur.

Le taux d'humidité est calculé par la formule suivante :

$$\frac{d_1}{H} (\%) = \frac{\left(\frac{e_{ul}}{P_1} + \frac{t_1}{P_2}\right) - \frac{m_{ule\ sul}}{P}}{x100}$$

Où :

P1 : poids du bécher en g ; **P2** : poids de la prise d'essai ; **P** : poids du bécher contenant l'échantillon après chauffage.

5.3 Détermination de la teneur en sel (Méthode de MOHR)

La détermination de la teneur en sel dans la margarine, consiste à dissoudre 5g d'échantillon dans 100ml d'eau distillée bouillante. Le mélange obtenu est ensuite titré par une solution de nitrate d'argent AgNO_3 (0,1N) en présence de quelques gouttes de chromate de potassium, utilisé comme un indicateur coloré. Le virage de la couleur en rouge brique indique la formation d'un précipité de chlorure d'argent (AgCl).

La teneur en chlorure de sodium est donnée par la formule suivant :

$$\frac{TS}{100} (\%) = \frac{58,5 \times V \times N}{10P}$$

Où :

Ts : Taux de sel (%) ; **V** : Volume (ml) de la solution de nitrate d'argent utilisée pour la prise d'essai ; **N** : Normalité de la solution de nitrate d'argent (0,171N) ; **58,5** : Masse molaire (g/mol) du chlorure de sodium ; **P** : La prise d'essai en gramme (g).

5.4 Détermination de l'indice de peroxyde (ISO, 2007)

Le principe repose sur le traitement d'une prise d'essai en solution dans un mélange d'acide acétique et de chloroforme, par une solution d'iodure de potassium (KI). L'iode libéré est titré par une solution de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) en présence d'amidon comme indicateur de couleur. Selon le protocole de **Wolff (1968)**, dans un ballon 2g de la phase grasse sont mélangés avec 10ml de chloroforme, 15ml d'acide acétique et 1ml d'iodure de potassium (3.10-3M) ; l'ensemble est incubé à l'obscurité pendant 5mn avant d'y ajouter 75ml d'eau distillée et quelques gouttes d'empois d'amidon. La titration est réalisée avec une solution de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) à 0,01N jusqu'à l'apparition de la couleur mère.

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

$$\frac{\text{rés exprimé par l}}{IP \left(\frac{\text{meq O}_2}{\text{kg}} \right)} = \frac{m}{N} \times \left(\frac{V_1 - V_0}{P} \right) \times \frac{1000}{1000}$$

Où :

IP : Indice de peroxyde exprimé en milliéquivalent gramme par kilogramme ; **V₀** : volume de la solution de thiosulfate de sodium pour l'essai à blanc en ml ; **V₁** : volume de thiosulfate de sodium pour l'échantillon en ml ; **N** : normalité de la solution de thiosulfate de sodium 0.002N ; **P** : prise d'essai en gramme.

5.5 Détermination du point de fusion (NE, 1988)

Il consiste à mesurer la température à laquelle une matière grasse solidifiée dans un tube capillaire se ramollit jusqu'au point où elle remonte dans le tube. La méthode de **Wolff (1968)** est adoptée ; environ 1cm de phase grasse fondue est versé dans deux tubes capillaires qui sont ensuite placés au congélateur. Après 20mn, ils sont suspendus dans un bécher rempli d'eau dans lequel est plongé la sonde d'un thermomètre. Le bécher est chauffé de façon que la température s'élève d'environ 0,5°C par mn, et la température est notée au moment où la matière grasse monte dans les tubes capillaires.

La température notée correspond au point de fusion de la margarine, elle est exprimée en °C.

5.6 Détermination de l'acidité (ISO, 2007)

Il repose sur le traitement d'une prise d'essai de la margarine par un mélange d'éthanol et d'oxyde diéthylénique, puis un titrage d'acides gras libres présents à l'aide d'une solution

éthanolique d'hydroxyde de sodium. Dix grammes de margarine sont additionnés de 50 ml d'éthanol neutralisé et quelques gouttes d'indicateur coloré (phénolphtaléine) ; le mélange est titré avec de soude jusqu'à apparition d'une coloration rose pâle.

L'acidité du corps gras (margarine) est déterminée comme suit :

$$A (\%) = \frac{N \times V \times M}{10P}$$

Où :

A : acidité exprimée en %.

N : normalité du NaOH utilisé (0.1 N).

V (ml) : volume du NaOH utilisé.

M : poids moléculaire de l'acide oléique (282 g/mole).

P : masse de la prise d'essai en g.

5.7 Détermination du taux de solide par RMN (teneur en corps gras solides) (ISO, 1995)

Afin de déterminer le taux de solide dans les échantillons de margarines, une quantité de chaque échantillon est fondue ; la phase grasse récupérée est versée dans des tubes à raison de 3cm. Les tubes sont incubés à 0°C pendant une heure ; un tube est gardé à 0°C, les autres sont placés à dans différentes températures. Chaque tube est introduit dans l'RMN et leur SFC est lu sur l'écran.

6. Analyses microbiologiques des margarines élaborées

Les risques de contamination microbiologiques de la margarine proviennent surtout de la phase aqueuse, car les huiles constituent un milieu défavorable au développement des bactéries. Cette phase est plus vulnérable aux contaminations microbiennes, ainsi le lait même pasteurisé, peut servir de milieu de culture à des microorganismes introduits accidentellement (karleskined, 1992).

Les bactéries, les levures et les moisissures provenant de la phase aqueuse, détériorent la qualité de la margarine en libérant des acides gras libres, des aldéhydes et des cétones responsables des mauvaises odeurs. La margarine est un produit sain, mais les bactéries sont des agents sournois (karleskined, 1992).

Les analyses microbiologiques sont réalisées sur les produits finis afin de déterminer leur qualité hygiénique. Elles englobent le dénombrement des microorganismes et la recherche de certains germes pathogènes (germes aérobies, levures et moisissures, coliformes fécaux, *Staphylococcus aureus* et Salmonelles).

➤ **Préparation de la solution mère**

40 g de chaque margarine à analyser sont pesés; 34 ml de la solution Ring sont ajoutés l’erlenmeyer contenant le mélange est bouché avec le coton cardé et du papier aluminium, ensuite il est porté en bain–marie à 45°C jusqu’à dissolution et séparation des deux phases.

Les études quantitatives et qualitatives sont réalisées à partir de la solution mère de la margarine et de ses dilutions décimales (10^{-1} et 10^{-2}). Ces dilutions sont réalisées par la méthode classique, en utilisant l’eau physiologique stérile.

Les dénombrements sont réalisés selon le tableau suivant :

Tableau VI : Germes recherchés dans les margarines élaborées et les conditions d’analyse.

Germes recherchés	Prélèvement	Milieu	Ensemencement	Incubation	Résultat	Méthode d’essai
Germes aérobies	1ml de la solution mère 1ml de la dilution 1/10	PCA	En masse	30°C/72h	Colonies blanches	ISO : 4833
Levures et Moisissure	1ml de la solution mère 1ml de la dilution 1/10	OGA	En masse	30°C/72h	Colonies Rondes et opaques	ISO : 21527-2
Coliformes	1ml de la solution mère	VRBL	Double couche	44°C/24 à 48	Colonies rouges-violettes	ISO : 7251
Staphylococcus aureus	1ml de la solution mère	BP	En masse	37°C/24 à 48	Colonies noires avec un halo	ISO : 6888-1
Salmonelles	2,5 de SM+ 225 ml d’eau peptonée	SFB	En masse	37°C/24 à 48	Colonies vertes-bleues et centre noir	ISO : 6579

7. Analyse statistique

Une analyse descriptive des résultats est réalisée à l'aide du logiciel Microsoft Office Excel 2010, pour calculer les moyennes, les écarts types et les coefficients de corrélation.

Une analyse de la variance (ANOVA) à un seul facteur au seuil de probabilité $P < 0,05$ est appliqué à l'aide du logiciel STATISTICA (5.5).

Partie
pratiques

Chapitre IV

1. Paramètres physico-chimiques

Le tableau ci-dessous résume les teneurs moyennes des différents paramètres physico-chimiques déterminés sur le jus de grenade.

Tableau VII : Paramètres physico-chimiques du jus de grenade.

Paramètre	Teneur moyenne
pH	4,26±0,02
Brix(%)	19,13±0,04
L'acidité titrable(g/ml)	3,97± 0,17
Taux d'humidité (%)	85,09±0,09

1.1. pH du jus de grenade

Le jus de grenade de la variété étudiée présente un pH qui est de 4,26±0,02. Cette valeur est similaire à celle obtenue par **Ismail et al. (2014)** qui est de 4,28 pour le jus de grenade de variété Egyptienne et à celle enregistrée par **Ilham Hmid (2014)** et qui est de 4,22 pour un cultivar de grenade Marocain.

Ce pH confère au jus de grenade une protection contre les microorganismes sensibles au pH acide, mais peut être altéré par les moisissures, comme c'est le cas de la majorité des jus de fruit.

1.2. Brix du jus de grenade

Les constituants prédominants de la matière soluble en suspension dans le jus de grenade sont les sucres solubles (**Poyrazoglu et al., 2001**).

Le degré de Brix obtenu pour le jus de grenade analysé est de 19,13±0,04%, cette valeur est comprise dans l'intervalle des normes générales du CODEX pour les jus de fruits et nectars de fruits qui définit le degré de Brix pour le jus de grenade est de 12 % (**CODEX, 2005**). Elle est aussi similaire à celle rapportée par **Zareiet al. (2009)** qui est de 19,56±0,39%, pour le jus de grenade de cultivar d'Iran.

Les jus ayant une valeur de Brix de plus de 20 %, sont généralement considérés comme étant des produits concentrés (**Anonyme, 2002**).

1.3. L'acidité titrable du jus de grenade

L'acidité moyenne du jus de grenade analysé est de $3,97 \pm 0,17$ g/mL. Une étude menée par **Turkmen et Eksi (2011)** sur 45 échantillons de jus de grenade de Turkey et ont obtenu des acidités variant entre 2,80 et 30 g/ml.

Ces acides (acide citrique et acide malique et...) sont à l'origine du goût acidulé du jus de grenade et contribuent à sa valeur sensorielle (**Poyrazoglu et al., 2001**).

1.4. Taux d'humidité

L'eau existe dans la matière vivante à des teneurs variant entre 10 et 99,5%. Dans les tissus et les liquides biologiques, on trouve l'eau sous différentes formes ; la forme libre et la forme liée (**Audigiet al., 1984**).

La teneur en eau déterminée par la méthode d'étuvage est de $85,09 \pm 0,09\%$, cette valeur concorde avec celle obtenue par **Favier et al. (1993)** pour le jus de cultivar de grenade d'Iran qui est de 85,4 %.

Ces résultats sont proches de ceux de la plupart des jus de fruits tels que l'ananas (86%), raisin (85%) et d'orange (87%) (**Vierling, 2004**).

Cette teneur élevée en eau confère au jus de grenade, un pouvoir hydratant et rafraîchissant.

La teneur en eau d'extrait d'écorces de grenade est de 11,93 %, cette valeur est similaire de celle obtenue par **Hmid, (2014)** pour un cultivar de grenade Marocain (12%).

2. Teneur en antioxydants dans les écorces de grenade

Le tableau VII résume les teneurs en antioxydants dosés dans l'extrait d'écorces de la grenade.

Tableau VIII: Teneurs d'écorces de la grenade en antioxydants.

Antioxydants	Teneur
Composés phénoliques totaux(mg EAG/100g MS)	926,74 ±36,54
Flavonoïdes (mg EQ/100g MS)	625,20±4,19
Tannins condensés(mg EC/100g MS)	174,79 ±14,74

2.1 Les composés phénoliques totaux

La teneur en composés phénoliques totaux de l'extrait d'écorces de grenade est de 926,74±36,54mg EAG/100g MS. Cette valeur est supérieure à celle rapportée par **Elfallehet al. (2012)** pour l'extrait d'écorces d'un cultivar de grenade Tunisien(856±48,7mg EAG /100 g MS).

2.2 Les flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes dans l'extrait d'écorces de grenade est de 625±4,19mg EQ /100 g MS et cette valeur est également supérieure à celle obtenue par **Elfallehet al. (2012)** concernant l'extrait d'écorces d'un cultivar de grenade Tunisien(515,22±8,14mg EAG /100 g MS).

2.3 Tannins condensés

La teneur en tannins d'extrait d'écorces est de 174,79±14,74mg EC /100 g MS. Cette valeur est supérieure à celle notée par **Rajanet al. (2011)** pour l'extrait d'écorces d'un cultivar de grenade Marocain(81.66±3.51mg EC /100 g MS).

3. Activités antioxydante et antiradicalaire

3.1 Pouvoir réducteur

Les résultats de pouvoir réducteur d'extrait d'écorces de grenade et de deux standards (quercétine et le BHA) sont présentés dans la figure 10 :

Les résultats obtenus montrent que l'extrait testé possède un potentiel intéressant dans la réduction du fer oxydé. L'absorbance enregistrées pour l'extrait d'écorces est de 0,53 nm à une concentration de 0,46 mg/ml.

Pour évaluer l'efficacité d'extrait d'écorces et de graines de grenade, deux standards souvent utilisés en industries alimentaire et non alimentaire sont testés : le BHA et la quercétine. Le pouvoir réducteur des échantillons exprimé en absorbance est de 0,56 ; 0,47 nm pour BHA utilisé à deux concentrations 0,16 ; 0,12 mg/ml respectivement et 0,63 ; 0,42 nm pour la quercétine utilisée à deux concentrations 0,12 ; 0,08 mg/ml respectivement.

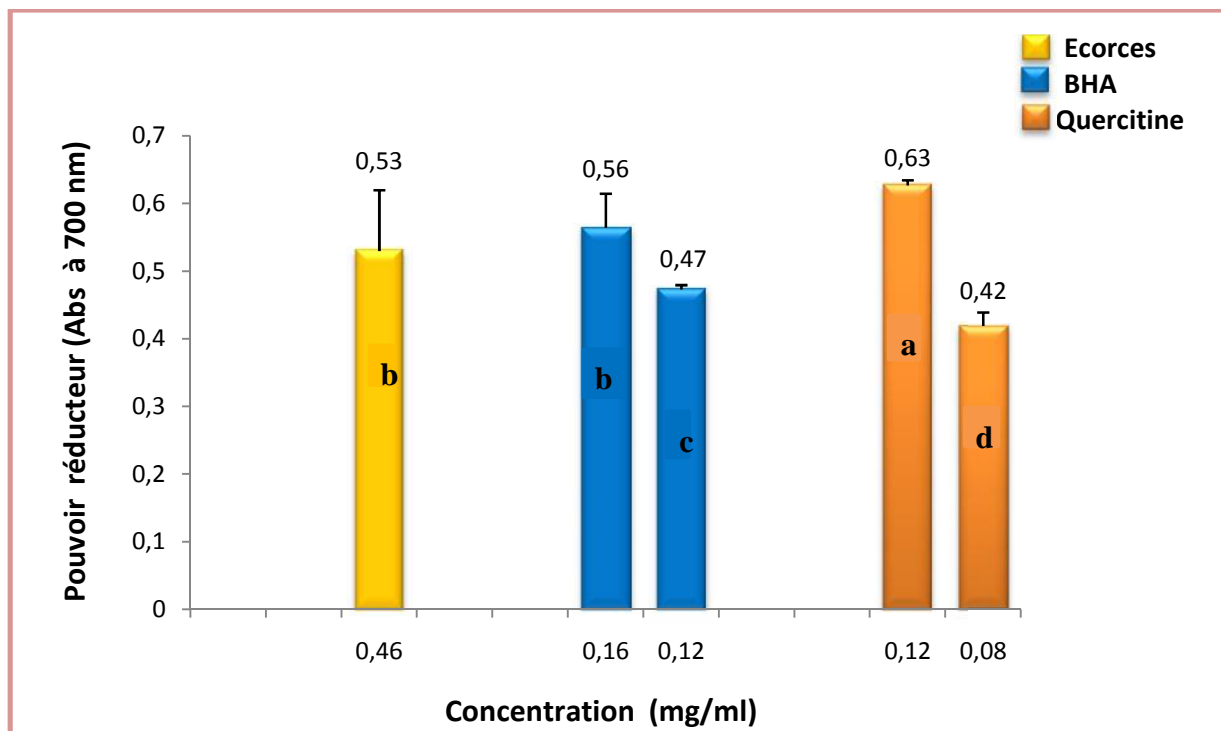


Figure 11: Pouvoir réducteur de l'extrait d'écorces de grenade et des standards (quercétine et BHA).

Les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative. $a > b > c > d$ à $P < 0,05$.

Les différences observées sont significatives à $P < 0,05$. Pour réduire l'oxydation à environ 50%, la concentration de l'extrait nécessaire est moins de trois fois supérieure de celle du BHA et de la quercétine. La performance de l'extrait d'écorces de grenade paraît proche de celle des standards testés.

3.2 Activité antiradicalaire sur le DPPH

La figure 11 présente les pourcentages du pouvoir antiradicalaire d'extrait d'écorces et des standards (BHA, Quercétine).

Les résultats montrent que tous les extraits sont susceptibles de piéger le radical DPPH à un pourcentage qui dépasse les 50%. L'extrait d'écorces de grenade a donné un pourcentage

d'inhibition de 50,54%. Les meilleures activités sont attribuées aux standards BHA et Quercetine utilisés à 0,08 et 0,04 mg/ml et dont les pourcentages d'inhibition obtenus sont de 55,65 - 40,29% et 62,61 - 41,55% respectivement. Le pourcentage d'inhibition de l'extrait se trouve dans l'intervalle de ceux obtenus pour les deux standards.

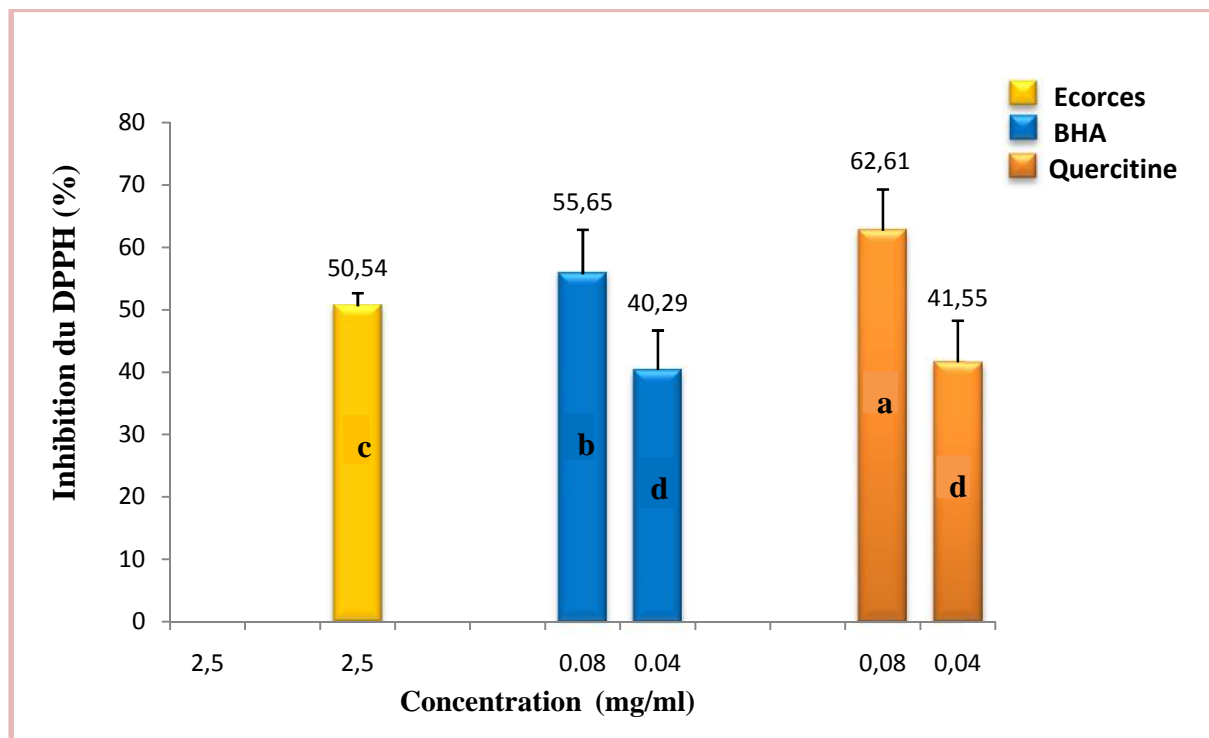


Figure 12 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH par l'extrait d'écorces de grenade et des standards (BHA, Quercetine).

Les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative. $a > b > c > d$ à $P < 0,05$.

L'analyse statistique a montré l'existence d'une différence significative ($p < 0,05$) entre l'extrait d'écorces de grenade et des standards (BHA /Quercetine).

La capacité de piégeage du radical est classée dans l'ordre suivant : Quercetine > BHA > L'extrait d'écorces.

Il a été apporté par **Chunget al. (2006)** que l'activité scavenger du radical DPPH par les extraits peut être accordée à la présence d'un groupement hydroxyle, à la structure moléculaire du composé, à la disponibilité de l'hydrogène phénolique, et à la possibilité de la stabilisation du radical formé résultant d'un donneur d'hydrogène. Elle pourrait également être

due aux effets synergique entre divers classe d'antioxydants présents dans l'extrait (composés phénoliques, flavonoïdes, caroténoïdes.....).

4. Suivi de l'évolution de la stabilité oxydative des margarines élaborées

L'élaboration des margarines de table à l'échelle laboratoire a été dans le but de déterminer la concentration nécessaire de l'extrait d'écorces de grenade en vue de son incorporation dans la margarine. Des margarines avec des concentrations de 50ppm, 100ppm et 150ppm d'extrait d'écorces de grenade et une margarine référence avec 100ppm de vitamine E sont préparées dans les mêmes conditions. La stabilité des margarines sont évaluées par un suivi des paramètres physico-chimiques et microbiologique pour une période de 90 jours.

5. Margarine élaborées

5.1 Propriétés physico-chimique des margarines élaborées

L'ensemble des résultats physico-chimiques des margarines à l'échelle laboratoire sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau IX : Propriétés physico-chimique des 4 margarines élaborées à l'échelle laboratoire.

Margarine Analyse effectuée	ME1	ME2	ME3	ME4	Normes ISO
pH(Phase aqueuse)	4,9 ± 0 ^a	4,9 ± 0 ^a	4,9 ± 0 ^a	4,9 ± 0 ^a	4,5-5
Humidité (%)	14,5 ± 0 ^a	15,13 ± 0 ^b	15,13 ± 0 ^b	14,2 ± 0 ^a	Max 16
Acidité	0,18 ± 0 ^a	0,19 ± 0 ^b	0,19 ± 0 ^b	0,19 ± 0 ^b	Max 0,2
La teneur en sel (%)	0,54 ± 0 ^b	0,50 ± 0 ^a	0,52 ± 0 ^a	0,56 ± 0 ^b	0,6
Point de fusion (°C)	36,5 ± 0 ^a	36,5 ± 0 ^a	36,5 ± 0 ^a	36,5 ± 0 ^a	28 à 37
Indice peroxyde	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	Max 10

Les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative (a<b) à P 0,05.

ME₁: Margarine Témoin à 100ppm ;ME₂,ME₃ et ME₄: Margarine élaborées avec l'extrait d'écorces de grenade a des concentrations (50ppm , 100ppm et 150ppm) respectivement.

a. Ph

La détermination de pH renseigne sur l'état de fraîcheur de l'échantillon. Les résultats de pH de la phase aqueuse des 4 margarines élaborées est de 4,9 rentrent dans l'intervalle des normes fixées par l'entreprise qui est 4,5-5.

b. Taux d'humidité

D'après la norme **ISO 662 (1998-90-1)**, le taux d'humidité d'une margarine ne doit pas dépasser 16%, néanmoins, l'entreprise tolère des taux entre 16 et 18%. Les margarines élaborées ME1, ME2, ME3 et ME4 présentent des taux 14,5, 15,13,15,13 et 14,20 respectivement. Les deux margarines ME2 et ME3 renferme significativement plus d'eau, ceci est peut être dû à un défaut de dosage de la phase aqueuse au cours de la fabrication de la margarine.

c. Acidité et indice d'acide

D'après **Karleskind, (1992)**, un corps gras est à l'abri de l'altération par hydrolyse si son acidité est 0,2%.

D'après les résultats obtenus, l'acidité des 4 margarines élaborées est conforme à la norme puisque les valeurs enregistrées sont nettement inférieures à 0,2%. Ce constat prouve la faible teneur en acides gras libres des 4 échantillons analysés.

d. Teneur en sel

En plus de son rôle dans l'amélioration de goût et de la sapidité dans la margarine, le sel joue aussi un rôle bactériostatique.

Les taux de sel dans les 4 échantillons sont de l'ordre 0,54, 0,50, 0,52 et 0,56 dans les margarines élaborées ME1, ME2, ME3 et ME4 respectivement. Ces résultats sont conformes à la norme fixée par l'entreprise (0,6 %).

La différence notée au niveau des teneurs en sel peut être expliquée par une erreur au niveau de la préparation de la solution de saumure.

e. Point de fusion

Le point de fusion donne une indication sur la température à laquelle la margarine devrait se fondre dans la bouche.

Selon la composition de la margarine, celle-ci pourrait fondre entre 28 et 37 °C comme l'indique les normes fixées par l'entreprise. Les margarines élaborées sont conformes à ces normes ; ME1, ME2, ME3 et ME4 fondent à 36,5°C.

f. Indice de peroxyde (indice de qualité)

L'indice peroxyde est le nombre d'oxygènes libres en Meq d'O₂/Kg de corps gras ; il renseigne sur le degré d'oxydation de ce corps. L'indice de peroxyde est un critère très utile et d'une sensibilité satisfaisante pour apprécier les premières étapes d'une détérioration oxydative (Karleskind, 1992).

D'après les résultats obtenus, les indices de peroxyde des 4 échantillons sont de 0 Meqd'O₂/Kg pour les 4 margarines élaborées. Cette valeur est inférieure au seuil fixé par l'entreprise (Max 10).

g. Taux de solide, SFC (Solid Fat Content)

Le SFC est un facteur essentiel car il est responsable de plusieurs caractéristiques d'un produit, y compris son aspect général et ses propriétés organoleptiques (Noor Lida *et al.*, 2002). Selon des protocoles définis par IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), le SFC est le pourcentage de triglycérides solidifiés dans une huile à une température donnée, il peut être utilisé en tant qu'une mesure du degré de cristallisation des graisses. Il peut être utilisé pour la description de la cristallisation et du comportement des mélanges de matières grasses pendant le traitement (Bongers *et al.*, 2011).

Les résultats de taux de solide sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Tableau X: Taux de solide des 4 margarines élaborées (%)

Echantillon/Température	0°C	10°C	20°C	30°C	40°C
ME1 à 100ppm vit E	32,81± 0 ^b	25,57± 0 ^a	12,67 ± 0 ^b	4,82 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
ME2 à 50ppm d'extrait	32,81 ± 0 ^b	25,57 ± 0 ^a	12,67 ± 0 ^b	4,82 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
ME3 à 100ppm d'extrait	32,81 ± 0 ^b	25,57 ± 0 ^a	12,67 ± 0 ^b	4,82± 0 ^a	0 ± 0 ^a
ME4 à 150ppm d'extrait	32,81 ± 0 ^b	25,57 ± 0 ^a	12,67 ± 0 ^b	4,82 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a

Les valeurs portant les mêmes lettres ne présentent aucune différence significative. (a<b) à P 0,05.

Conclusion

La présente étude a pour but de substituer le vit E souvent utilisée comme antioxydant dans les aliments tels que la margarine, par des extraits obtenus à partir de déchets alimentaires représentés dans ce cas par les écorces de grenade (*Punicagranatum L.*). La procédure à suivre est brièvement, tout d'abord d'obtenir l'extrait d'écorces, de quantifier et d'évaluer l'activité antioxydante de ses composants et enfin d'incorporer celui-ci dans la margarine de table.

Les écorces obtenues à partir de variété de grenade *Lahlou*, récoltée dans la région de Tamezrit, possèdent un taux d'humidité élevé, ce qui indique que les composants extraits sont de nature hydrophile et que par conséquent leur incorporation doit se faire dans la phase aqueuse pour favoriser leur dissolution.

Les résultats des dosages d'antioxydants dans l'extrait éthanolique d'écorces de grenade obtenus révèlent des teneurs importantes en composés phénoliques, flavonoïdes qui jouent un rôle important contre l'oxydation. A ce propos, l'étude des activités antioxydante et antiradicalaire de cet extrait, a mis en avant particulièrement, la performance de celui-ci vis-à-vis de l'oxydation du fer ferrique.

Les tests réalisés au niveau de société des corps gras de Béjaïa CO.G.B-« laballe », ont permis de déterminer à partir de différentes concentrations d'extrait d'écorces, qui pourraient substituer la vit E (utilisée à 100ppm). Le suivi de l'évolution des margarines formulées au cours de trois mois de stockage à 4°C, a révélé que même à concentration plus faible (50%) de celle du vit E, les margarines élaborées résistent à l'oxydation que la margarine témoin. Par ailleurs, les propriétés physico-chimiques (pH, taux de solide et point de fusion, acidité, indice de peroxyde....) s'avèrent conformes à la recette préétablie et aussi aux normes internes et réglementaires. Il en est de même pour les résultats microbiologiques, ce qui permet de déduire que les margarines élaborées avec l'extrait d'écorces et aussi d'une bonne qualité que celle commercialisée par CO.G.B-« laballe ».

Afin d'élargir cette étude, d'autres aspects peuvent être développés tels que :

- Purifier l'extrait afin d'identifier les types d'antioxydants présents dans l'extrait ;
- Élargir la valorisation de sous-produit d'écorces de grenade dans d'autres domaines agro-alimentaire ;
- Effectuer des recherches plus approfondies sur le pouvoir antioxydant, les effets thérapeutiques... de ces sous-produits ;
- Améliorer les conditions de culture de la grenade et construire éventuellement des unités spécialisées dans la valorisation des différentes parties de ce fruit.

Références

bibliographiques

A

Aboke C., Benarou A., Dolez M., Guillet K., Jamet E., Moreau A., Moutouvirin A., Poirier M. et Ranga P. (2008). Le beurre et la margarine : Rapport de rhéologie. Ecole Supérieure de Microbiologie et Sécurité Alimentaire de Brest (ESMISAB), Université de Bretagne Occidentale. p105.

Alais C., Linden G. Miclo L.(2003). Biochimie alimentaire, 6^{ème} édition de l'abrégé. *Edition: Dunod. Paris*, p41-68.

Al-Said F.A., Opara U.L. Al-Yahyai R.A. (2009). Physico-chemical and textural quality attributes of pomagranate cultivars (*Punicagranatum L.*) grown in the Sultanate of Oman. *Journal of Food Engineering* 90: 129-134.

Anonyme, (2002). Classement des jus et des jus concentré sous la position 20.09. (Agence des services frontaliers du Canada). Mémoire D10-14-4. Ottawa, le 30 août 2002.

Anonyme, (2016). Plants profile: *Punicagranatum*. Naatural Resource Conservation service, United states Department of Agriculture. www.plants.usda.gov.

Audigie J., Figarella F., Zonszain. (1984). Manipulations d'analyses biochimiques. 1^{ère} édition, 4^{ème} tirage. Paris : DOIN EDITEUR. 273 p. (biologie appliquée). ISBN 2-7040-0428-5.

B

Bennick A. (2002).Interaction of plant polyphénols with salivary protiens. *CriticalReviewsinOralBiology and Medicine*, 13(2):184-196.

BlithovenS.(2006).Etablissement des critères relatifs aux cargaisons précédentes acceptables pour les graisses et les huiles. 45-48.

Bongers, Jeroen J. Briaire,Erika H. van der Veen, Randy K. Kalkman, Johan H. M. Frijns. (2011).Threshold Levels of Dual Electrode Stimulation in Cochlear Implants. *Journal Assoc Res Otolaryngol*.14(5): 781–790.

Birlouez-aragon I. et al., 1995. Dossier Scientifique de l'Institut Français pour la Nutrition n°5 : Les Vitamines, 144p.

Boucher S., Plassiart G., Adamus C. 1998 .Cas de Carence en vitamine E dans trois élevages de Cobayes, *Point Vét.* Vol 29, n°190, p 85-90.

C

Cillard J et Cillard P. (2006). Mécanisme de la peroxydation lipidique et des antioxydants. *Oléagineux, Corps gras, Lipides.* 13 : 24-29. *Japanese Journal of Nutrition*, 44: 307-315.

Chung, M.I., Ming, M., Stahl, R.J., Chan, E., Parkinson, J., and Keeley, F.W. (2006). equences and domain structures of mammalian, avian, amphibian and teleost tropoelastins: Clues to the evolutionary history of elastins. *Matrix Biol.* 25(8): 492-504.

CeliktasYesil, E. Bedir, F. Vardar Sukan .(2007). In vitro antioxidant activities of Rosmarinusofficinalis extracts treated with supercritical carbon dioxide. University Science and Technology Center,Department of Bioengineering, Faculty of Engineering, Ege University, 35100 Bornova-Izmir, Turkey.

Codex, (2005). Normes générales CODEX pour les jus et les nectars de fruits. CODEX STAN 247-2005. P 1-17.

D

Desalme A., Ouilliot D. Ziegler O.(2004). Les catégories d'aliments. Cahiers de Nutrition et de Diététique. 39 : 12p.

Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N. (2006).

Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, p654-660.

E

Elfalleh W., Hannachi H., Tlili N., Yahia Y., Nasri N., Ferchichi A. (2012).Total phenolic contents and antioxidantactivities of pomegranatepeel, seed, leaf and flower.Institut des Régions Arides de Médenine, Laboratoire d'Aridoculture et Cultures Oasiennes, 4119, Tunisia.Laboratoire de Biochimie, Département de Biologie, Faculté des Sciences de Tunis, Université de Tunis El Manar, 2092, Tunisia.

Elodie W. (2009). Le grenadier (Punicagranatum): Plante historique et évolutions thérapeutiques écentes.Faculte de pharmacie, université Henripoincare-Nancy1.

Espiard E. (2002). Introduction à la transformation industrielle des fruits. TEC&DOC-Lavoisier, Paris, France, 181-182.

Eymard S.(2003). Mise en évidence et suivit de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation de chinchard (Trachurustrachurus): choix des procédés. Ecole Polytechnique de l'Université de Nantes.

F

Favier JC., Ireland-ripert J., Laussuq C., Feinberg M.(1993).Répertoire général des aliments: table de composition des fruits exotiques, fruit de cueillette d'Afrique. Tome 3. ORSTOM édition. 213, rue lafayette-15480, PARIS cedex 10. INRA édition, 147, rue de l'université- 75338 Paris Cedex 07.

Fawole O.A., Opara U.L. Theron K.I. (2011). Chemical and phytochemical properties and antioiidant activities of three pomegranate cultivars grown in South Africa.Food Bioprocess Technology <http://dx.doi.org/10.1007/s11947-011-0533-7>.

Ferial A. Ismail, Somia H., Abdelatif, Nehal R., El-Mohsen Shafika A. (2014). The Physico-Chemical Properties of Pomegranate Juice (*Punicagranatum*L.) Extracted From Two Egyptian Varieties. *World Journal of Dairy. Food Sciences*9: 29-35.

G

Genot C., Meynier A., Riaublanc A. et Chobert J.M.(2003).Protein alterations due to lipid oxidation in multiphase systems.AOCS Press, Champaign, Blaubeuren.45: 265-292.

German J.B. et Kinsella J.E.(1985). Lipid oxidation in fish tissues, enzymatic initiation via lipoxygenase.*Journal of Agricultural and Food Chemistry*.33: 680-683.

Gessner M.O. et Steiner D. (2005). Acid butanol assay for proanthocyanidins (condensed tanins).*Springer*.Printed in The Netherlands.*A Practical Guide*, p107-114.

H

Hadi M. (2004). La quercetine et ses dérivés : molécules à caractérepooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de Doctorat en pharmacochimie. Université de Louis Pasteur Strasbourg I, Faculté des sciences, p22-24.

Hemingway R. W. (1992).Structural variation in proathocyanidins and their derivatives. In: Lpant polyphenols: synthesis, properties, significande. *Hemingway R W, Laks P. E. New York*.

Hercberg S., Galan P., Preziosi P., Bertrais S., Mennen L., Malvy D., Roussel A., Favier A. et Briancon S.(2004).A randomized, placebo-controlled trial of the healthe effects of antioxidantvitamins and minerals.Institut National de la santé et de recherche médicale. 164 : 2335-2342.

Holland D., Hatib K., Bar-Ya'akov I. (2009). Pomegranate: botany, horticulture, breeding. *Horticultural Reviews*, 35: 127-191.

I

Ilham Hmid, (2014). Contribution a la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (*Punicagranatum*L.) : Caractérisation physico-chimique, biochimique et stabilité de leur jus frais. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36: 688-690.

Ismail., Ferial A.,Somia H., Abdelatif.,Nehal R., A bd El-Mohsen Shafika A. Zaki. (2014).The Physico-Chemical Properties of Pomegranate Juice (*Punicagranatum*L.) Extracted From Two Egyptian Varieties. Department of Food Technology, Faculty of Agriculture, Cairo University, Giza, Egypt.

J

Jeantet R., Bruté G., Croguenne T. Schuck P.(2006). Science des aliments : Biochimie-Microbiologie-Procédés-Produit. Ed: TEC et DOC, *Lavoisier, Paris*. 51-55.

Ju.(2005). Structure of alpa-tocophérol. Structural formulae http://commons.wikimidia.org/wiki/File:Alpa-Tocophérol_Structural_Formulae_V.1.svg. Consultée le 25 avril 2016 à 15 : 00.

K

Karleskind A.(1992). Manuel des Corps Gras. Ed: Tech & Doc, Paris.1579 p.

Kim H.J., Hahm T.S. et Min D.B.(2007).Hydroperxyde as a prooxidant in the oxydative stability of SoyebeanOil.*Journal of American Oil Chimistes Society.* 48: 349-355.

Kumbasli M. (2005). Etudes sur les composés polyphénoliques en relation avec l'alimentation de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneurafumiferana* (Clem.)). *Université Laval Québec.* Thèse de Doctorat.

Khan M.K. (2010). Polyphénols d'Agrumes (flavanones) : extraction de glycosides de la peau d'orange, synthèse de métabolites chez l'homme (glucuronides) et étude physico-chimique de leur interaction avec le sérum albumine. *Chimiedes aliments,* p8.

L

Laguerre M., Lecomote J. et Villeneuve P.(2007). Evaluation of the stability of antioxidants to counteract lipid oxidation : Existing methods, new trends and challenges. *Progress in LipidResearch.* 46: 244-289.

Lansky E. P. Newman R. A. (2007).-*Punicagranatum* (pomegranate) and its potentiel for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Pharmacology.* 109: 177-206.

Levin G. M. (1994).Pomegranete(*Punicagranatum*) plant genetic resources in Turkmenistan. *Plant Genetic Resources Newsletter,* 97:31-37.

Li B.B., Smith B. Hossain M.M. (2006). Extraction of phenolies from citrus peels in solvent extraction method.*Separation and purification Technology,* 48:148-188.

Liu X., Mouming Z., Wang J., Yang B., Jiang Y. (2008). Antioxidant activy of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthusemblica* L.) from six regions in China. *Journal of Food Composition and Analysis,* 21:219-228.

Lopes-Luts D., S. Alviano D., S. Alviano C., P. Kolodziejczyk P. (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils *Phytochemistry,* 69:1732-1738.

M

Marxen K., K H Vanselow.,Lippemeier k. S., Ralf. Hintze., A. Ruser., U-P Hassen.(2007). Determination of DPPH Radical Oxydation Caused by Methanolic Extraction of Some Microlgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements. Full Reasearch Paper, 7:2080-2095.

Mirdehghan S.H. Rahemi M.(2006). Seasonal changes of mineral nutrients and phenolics in pomegranate (*punicagranatum L.*) fruit.*Scientahorticulturae*. 111: 120-127.

Mohamed Amine B.(2012). Le grenadier tunisien (*Punicagranatum*) stimule le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12 via la voie insulino-dépendante de l'Akt et la voie insulino-indépendante de l'AMPK.Département de pharmacologieFaculté de Médecine, Université de Montréal.

Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH°) for estimating antioxidant activity Songklanakarinn.*Original Articl*, 26 : 211-219.

Morton J.F.(1987).Pomegranate.In : Fruits of warm climates. Ed. creative resources systems.p352-355.

N

Noor Lida H.M.D., Sundram K., Siew W.L., Aminah A.Mamot S. (2002). TAG composition and solid fat content of palm oil, sunflower oil, and palm olein blends before and after chemical interesterification. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 79: 1137-1144.

NF EN ISO NormeInternationale. (1955). Méthode ISO 8292. Corps gras d'origines animale et végétale- détermination de la teneur en corps gras solides par la méthode de la résonance magnétique nucléaire pulsée. Edition: 2.

NF EN ISO NormeInternationale. (1998). Méthode ISO662. Les graisses et huiles animales et végétale la détermination du contenu des impuretés insolubles. and oils – Détermination of peroxide value – Iodometric (visual) endpoint determination.

NF EN ISO NormeInternationale. (2007). Méthode ISO3960. Animal and vegetable fats.

O

Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*,44: 307-315.

P

Pennock J.F, Hemming F.M., Kerr J.D.A. (1964). A reassessment of tocopherol chemistry.*Biochemistry and biophysics Resources commun*, 17:542-548.

Peronny P. (2005). La perception gustative et la consommation des tannins chez les Maki. *Muséum National d'histoire Naturelle*. Thèse de Doctorat.

Pokorny J.(2003). Problème de stabilité des produits alimentaires liés la présence des lipides. Edition :*Lavoisier*. 55p.

Poyrazoglu E., Gokmen V., Artik N. (2002). Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punicagranatum* L.) grown in Turkey. *Journal of Food Compos Anal*, 15 : 567–575.

Prior E. (2003). Usage des corps gras alimentaires dans les différents secteurs de la technologie alimentaire. In : *Graille Journal. Edition. Lipides et corps gras alimentaires*, p87-147.

R

Rahmani M. (2007). Méthode d'évaluation de la stabilité oxydative des lipides. 2: 18-20.

Ribeiro M.C., Metzger J.P., Martensen A.C., Ponzoni F., Hirota M.M. (2009). Brazilian Atlantic forest : how much is left and how in the remaining forest distributed, Implications for conservation. *Biological Conservation*, 142:1141-1153.

Ribéreau-Gayou P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Edition. Dunod. Paris p1-23.

Rajan, M., V. Kishor Kumar, P. Satheesh Kumar, T. Venkatachalam, V. Anbarasan. (2011). Pharmacognostical and Phytochemical Studies of The Leaves of *Albizia Odoratissima* (L.F) Benth. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 3(3): 47-55.

S

Saillard M. (2010). Margarines et matières grasses tartinables. *Cahiers de nutrition et de diététique*. 45: 274-280.

T

Terrill T.H., Rown A.M., Douglas G.B., Barry T.N. (1992). Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Science*, 58:321-329.

Trémolieres. (1980). Manuel d'alimentation humaine. Les bases de l'alimentation Ed. ESF. 545pp.

Turkmen I., Eksi A. (2011). Brix degree and sorbitol/xylitol level of authentic pomegranate (*Punicagranatum*) juice. *Ankara University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering*, Ankara 06110.

U

USDA : United States Department of Agriculture. National Nutrients Database for Standard Reference. (2006). [http:// nal.usda.gov/pomegranate](http://nal.usda.gov/pomegranate).

V

Vanier P.(2005). La grenade au fil du temps.
http://www.passeportsante.net/fr/Nutrition/EncyclopedieAliments/Fiche.aspx?doc=grenade_nu.

Verzelloni E., Tagliazucchi D., Cont A. (2007).Relationship between the antioxidant properties and the phénolic and flavonoids content in traditional balsamic vinegar.*JOUFood chemistry*, 105:564-571.

Vierling E. (2004).Aliments et boissons : Filière et produits. Série de sciences et aliments. Dion éditeurs. Collection de BIOSCIENCE ET TECHNIQUE.

Villier A Genot C.(2006). Approche clinique et sensorielle de l'oxydation des lipides en émulsion. Thèse de l'AFECG : 152-159.

W

Wolff J.P. (1968). Manuel d'analyse des corps gras. Ed: Azoulay, Paris, France. 524p.

Z

Zarei M., Majid A., Zeinolabedin B. (2009). Evaluation of physicochemical characteristics of pomegranate (*Punicagranatum*L.) fruit during ripening.Dep. Hortic.Sci., Fac. Agric., Ferdowsi Univ. Mashhad, Mashhad, P.O Box 91757-1163.Tehran, Ira.

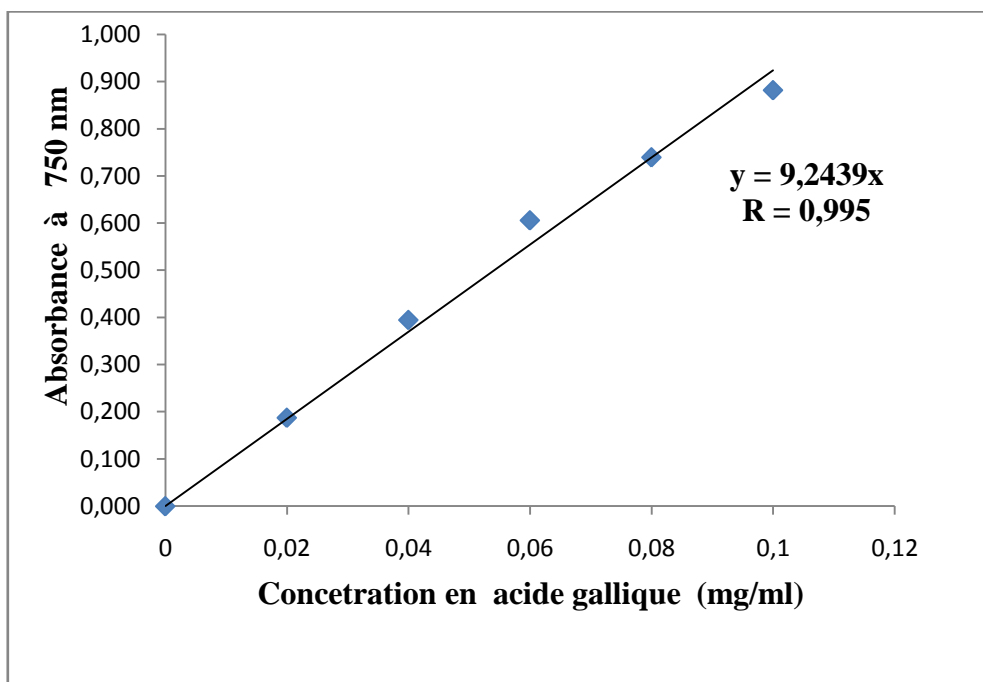
Zidani S.(2009). Valorisation des peleurs de tomates séchées en vue de leur incorporation dans la margarine. Université M'hamedBougara-Boumerdes.

Annexes

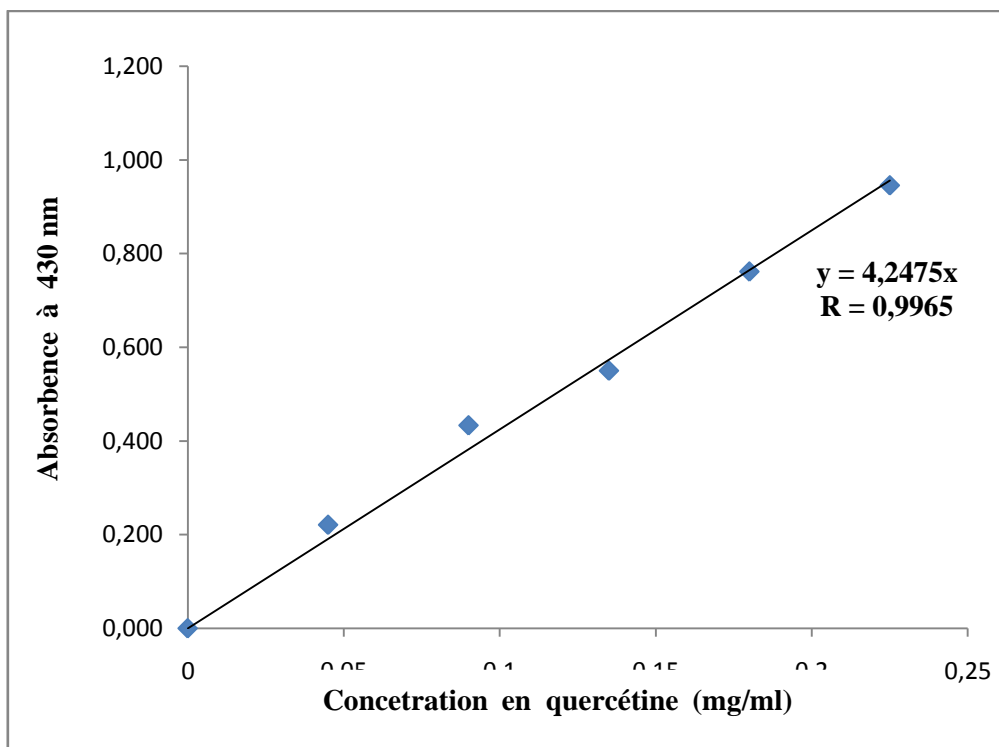
Annexes I

(a) Courbe d'étalonnage pour le dosage des composés phénoliques.

(b) Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes.



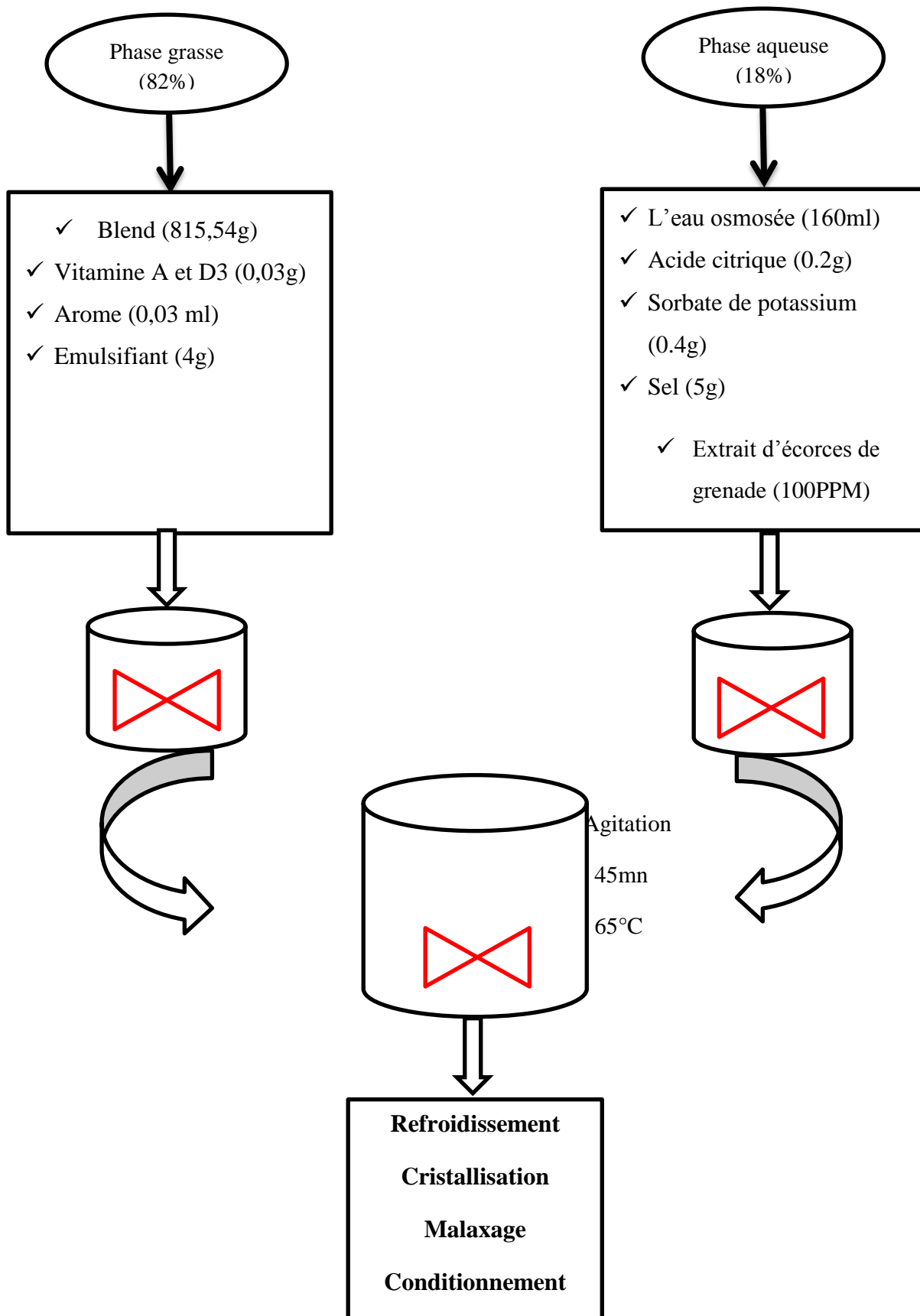
(a)



(b)

Annexe II

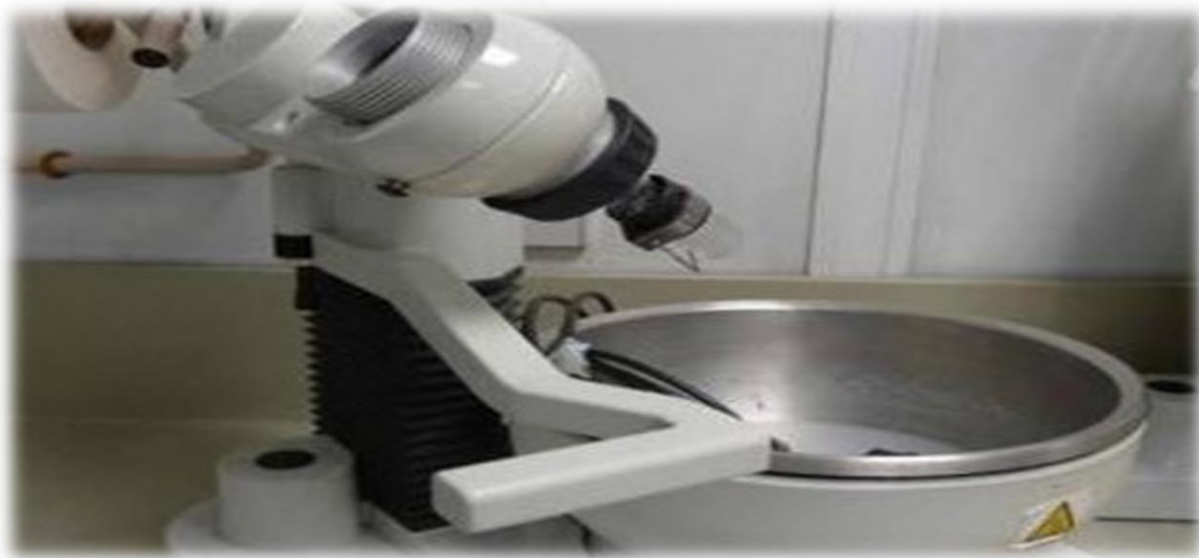
Schéma de la fabrication de la margarine (1Kg) au niveau de laboratoire de l'unité COGB La Belle Bejaia



Annexe III

(a) Appareil de Rotavapore de type (**Heidolph, Allemagne**)

(b) Spectromètre à résonance nucléaire (RMN) basse résolution de type (**minispecmq 20, Allemagne**)



(a)



(b)

Annexe IV

Résultats des propriétés physico-chimiques durent 90 jours

Margarine	ME1	ME2	ME3	ME4
Analyse effectuée				
pH (Phase aqueuse)	4,9	4,9	4,9	4,9
	4,9	4,9	4,9	4,9
Humidité (%)	14,5	15,13	15,13	14,2
	14,5	15,13	15,13	14,2
Acidité	0,18	0,19	0,19	0,19
	0,18	0,19	0,19	0,19
La teneur en sel (%)	0,54	0,50	0,52	0,56
	0,54	0,50	0,52	0,56
Point de fusion (°C)	36,5	36,5	36,5	36,5
	36,5	36,5	36,5	36,5
Indice peroxyde	0	0	0	0
	0	0	0	0

SFC (%)					
Margarines	0°C	10°C	20°C	30°C	40°C
ME1	32,81	25,57	12,67	4,82	0
	32,81	25,57	12,67	4,82	0
ME2	32,81	25,57	12,67	4,82	0
	32,81	25,57	12,67	4,82	0
ME3	32,81	25,57	12,67	4,82	0
	32,81	25,57	12,67	4,82	0
ME4	32,81	25,57	12,67	4,82	0
	32,81	25,57	12,67	4,82	0

Résultats des propriétés microbiologiques durent 90 jours

Margarine Gérmes	ME1	ME2	ME3	ME4
Germes aérobies mésophiles	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²
	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²
Levures et moisissure	<10	<10	<10	<10
	<10	<10	<10	<10
<i>Staphylocoques aureus</i>	<10	<10	<10	<10
	<10	<10	<10	<10
Coliformes fécaux	Absence	Absence	Absence	Absence
	Absence	Absence	Absence	Absence
Salmonelles	Absence	Absence	Absence	Absence
	Absence	Absence	Absence	Absence

RESUME

Cette étude rentre dans le cadre de la valorisation industrielle des sous-produits de grenade. L'étude est réalisée sur l'écorces de grenade (*Punicagranatum L.*) appelée *Lahlou*, de la région de Timezrit, (Bejaia). L'objectif a été de substituer le vit E utilisé comme antioxydant dans la conservation de certains aliments tels que la margarine. L'extrait éthanoloïque d'écorces obtenu a servi pour l'ensemble des analyses. Les résultats des dosages d'antioxydants ont montré la richesse d'écorces, particulièrement, en composés phénoliques (926,74mg EAG/100g MS), flavonoïdes (625,20 mg EQ /100 g MS) et en tannins (174,79mg EC /100 g MS). L'évaluation des activités antioxydantes et antiradicalaires par deux méthodes (pouvoir réducteur et inhibition du DPPH) a révélé des effets réducteurs intéressants vis à-vis de l'oxydation et qui sont proches de ceux de la quercétine et du BHA. Les tests réalisés à échelle laboratoire ont permis de montrer qu'avec l'extrait d'écorces de grenade, même à concentration plus faible(50%) de celle du vit E, les margarines élaborées résistent à l'oxydation que la margarine témoin, sans modification des propriétés physico-chimiques et microbiologiques. Les écorces de grenade constituent une bonne source de substances bioactives qui s'avèrent de grand intérêt et qui pourraient être exploitées dans différents secteurs agro-alimentaire.

Mots-clés : *Punicagranatum L.*, écorces de grenade, antioxydants, activités antioxydants et antiradicalaires, vitamine E, margarine, oxydation.

SUMMARY

This study falls within the framework of the industrial recovery of pomegranate byproducts. The study was conducted on pomegranate peel (*Punicagranatum L.*) called *Lahlou*, from the region of Timezrit (Bejaia). The aim was to substitute the vit. E used as an antioxidant in the preservation of several foods such as margarine. The ethanol extract obtained from the peels was used for all analyzes. The results of the assays showed high level in antioxidants content, particularly phenolic compounds (926.74 mg EAG / 100 g MS), flavonoids (EQ 625.20 mg / 100 g MS) and tannin (174.79 EC mg / 100 g MS). Evaluation of antioxidant and radical scavenging activity by two methods (reducing power and inhibition of DPPH) revealed interesting reducing effects that are close to those of quercetin and BHA. Tests carried out in laboratory scale showed that with the extract of pomegranate peel, even at 50% lower concentration than vit. E, margarines developed were resistant to oxidation, without modification of the physico-chemical and microbiological properties. Pomegranate peel constitutes a good source of bioactive substances that are proving of great interest and that could be used in different food sectors.

Keywords: *Punicagranatum L.*, pomegranate peel, antioxidants, antioxidant and antiradical, vitamin E, margarine, oxidation.