

République Algérienne démocratique et populaire

Université Abdelhamid Ibn  
Badis-Mostaganem  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس  
مستغانم  
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT D'AGRONOMIE

## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

M<sup>lle</sup> BELMILOUD Souria

Pour l'obtention du diplôme de

### MASTER EN AGRONOMIE

Spécialité BIOTECHNOLOGIE ALIMENTAIRE

THÈME

**Effet antimicrobien de l'huile de pépins de raisin  
sur certaines bactéries pathogènes**

Soutenue publiquement le 04/ 07 / 2018

DEVANT LE JURY

Président	M. AIT SAADA. D	M.C.B Université de Mostaganem
Encadreur	M. BENMILOUD. D	M. A Université de Mostaganem
Co-Encadreur	M. MAZARI. A	Maitre de recherche INRAA
Examineur	M. BEKADA. A	Professeur Université de Tissemsilt
Examinatrice	M. AIT CHAABANE	Professeur Université de Relizane

*Thème réalisé au Laboratoire de recherche INRAA El-HARRACH et  
De microbiologie N°01 de la faculté SNV-U.Mostaganem*

Année universitaire 2017 / 2018

## REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord **ALLAH** le tout puissant de m'avoir donné la santé la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce mémoire.

Je tiens particulièrement à remercier mon promoteur, **BENMILOUD DJAMEL-EDDINE**, pour avoir accepté la charge d'être rapporteur de ce mémoire, je le remercie pour sa disponibilité, ses pertinents conseils et de m'avoir guidé durant la préparation de mon mémoire de Master.

Ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien dans les moments les plus difficiles.

Qu'Il trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon respect.

Je remercie le Professeur **HAMADAN** de l'université de BOUMERDES pour ses nombreux conseils et suggestions scientifiques et techniques.

Je remercier également **M. DOUZANE MALIKA**, la responsable de laboratoire division technologie agroalimentaire de l' INRAA El- Harache, de m'avoir accueilli au sein de son équipe et d'avoir consacré une partie de son temps à me guider dans les missions qui m'ont été confiées au cours de ce stage.

Je remercie **M. MAZARI. A**, Maitre chercheur à l'INRAA, pour avoir codirigé ce mémoire et pour ses nombreux conseils et suggestions scientifiques et techniques.

Je remercie **M. AIT SAADA. D**, maitre-assistant classe B à l'université de Mostaganem D'avoir assuré la présidence du jury de ma soutenance.

Je remercie **M. AIT CHAABANE.** , professeur à l'université de Relizane D'avoir accepté d'être l'examinatrice de mon mémoire.

Je remercie **M. BEKADA. A** professeur à l'université de Tissemsilt d'avoir accepté d'être l'examineur de mon mémoire.

Je remercie tous les enseignants, les étudiants et les travailleurs del'université de Mostaganem et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ma formation pédagogique et scientifique.

Je remercie tous ceux et celles qui m'ont marqué par leur soutien et encouragements et je leur exprime mon respect et ma profonde sympathie : tous les membres de notre laboratoire et tous les collègues de ma promotion.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont à toute  
Personne Qui a participé de près ou de loin dans la réalisation de mon travail.

Merci à tous...

## DÉDICACE

*Je dédie ce travail*

***A mes très chers parents***

*En témoignage de mon affection et reconnaissance pour tout ce  
qu'ils m'ont donné*

*Sans vous je, ne serais jamais arrivé jusque  
là Je vous remercie pour votre soutien et votre  
amour*

*inconditionnel*

*Vous n'avez jamais hésité à vous sacrifier pour ma réussite et  
mon bonheur*

*A mes très chères Soeurs*

*A mes chers frères*

*A ma famille*

*A mes Chers*

*professeurs*

*Mes amis/es*

*ET à toute personne*

*qui me connaît.*



### Liste des figures

<b>Figure 01</b> : représente la structure du raisin (Article technique RFOE n°225(Pascal CHATONNET Ph.D).....	P.3
<b>Figure 02</b> : représente les compartiments de la baie de raisin (Article technique RFOE n°225(Pascal CHATONNET Ph.D).....	P.4
<b>Figure03</b> : représente la localisation des principales Molecules d'intérêt thérapeutique dans le raisin.....	P.7
<b>Figure 04</b> : Représentation du pépin de raisin et de ses structures cellulaires : C, cotylédons ; E, endosperme (albumen) ; EM, embryon ; Ep, épiderme ; II, tégument inférieur ; MI, tégument intermédiaire ; OI, tégument supérieur ; R, radicule (Levadoux, 1951 ; Ravaz, 1915).....	P.8
<b>Figure 05</b> : Localisation des composés phénoliques du pépin. Photographie d'une coupe de pépin à 123 JAF (jours après floraison), avec une coloration des tanins au DMACA11 (A) et des flavan-3-ols à la vanilline-HCl12 (B). VF = face ventrale, DF = face dorsale, II = tégument interne, MI = tégument intermédiaire, OI = tégument externe, R = radicule, Ep = épiderme (extrait de Cadot et al., 2006).....	P.10
<b>Figure 06</b> : Structure de l'acide gallique.....	P.10
<b>Figure07</b> : Structure des principaux flavanols chez le pépin (unités monomérique à gauche et procyanidines dimériques à droite).....	P.11
<b>Figure08</b> : Procédés classiques d'extraction d'huile à partir de graines oléagineuses, adapté de Gros (2005).....	P.15
<b>Figure09</b> : Configurations des trois catégories de presses continues : expandeur (A), expeller (B et C) et presse bivis (D) (Savoire et al., 2012).....	P.20
<b>Figure 10</b> : Effet du diamètre de la restriction sur le rendement en huile et la pression en tête de vis pour le pressage de graines de Jatropha (□, données obtenues sur l'expeller Sayari à 56 rpm (Beerens, 2007) et, données obtenues sur presse Komet S87G à 115 rpm (Karaj et Müller, 2011).....	P.21
<b>Figure11</b> : les bactéries lactiques du yaourt (Bourlioux et al ; 2011).....	P.38
<b>Figure12</b> : Diagramme présentant la technologie du yaourt (Jeantet., 2008).....	P.40
<b>Figure13</b> : représente les cépages des pépins de raisin des deux différentes régions la première de la wilaya de Mascara et la deuxième de Belabes.....	P.42
<b>Figure14</b> : Diagramme d'extraction de l'huile.....	P.43
<b>Figure15</b> : Image représentative du soxhlet.....	P.44
<b>Figure16</b> : image d'un rotavapeur (pour l'évaporation du solvant utilisé).....	P.45
<b>Figure17</b> : image représente le comptage des 1000 graines.....	P.45
<b>Figure18</b> : image représente un réfractomètre.....	P.47

<b>Figure 19</b> : image représente un sonicateur.....	P.48
<b>Figure20</b> : Diagramme d'extraction des polyphénols totaux des graines de pépin de raisin (Farhadi.K et al, 2016).....	P.49
<b>Figure21</b> : image d'un spectrophotomètre.....	P.50
<b>Figure22</b> : représente les extraits obtenus (V2 est plus foncé que les V1).....	P.50
<b>Figure23</b> : Structure chimique du radical libre DPPH et sa forme réduite (Drali. M et al, 2017).....	P.51
<b>Figure24</b> : image représente les différentes concentrations et la décoloration du DPPH.....	P.52
<b>Figure25</b> : Diffusion en gélose par la méthode des disques (Jorgensen et al., 1999; NCCLS, 1999).....	P.53
<b>Figure26</b> : représente un aromatoigramme (methode des disques).....	P.54
<b>Figure27</b> : représente le yaourt préparé (le témoin).....	P.55
<b>Figure28</b> : Zones d'inhibitions de l'huile de pépins de raisin (souche salmonelle).....	P.64
<b>Figure29</b> : Evolution de l'acidité des laits fermentés (type yaourt) additionnés de l'huile de pépins de raisin au cours de la période post-fermentation (1 <sup>ière</sup> préparation).....	P.66
<b>Figure30</b> : Evolution de l'acidité des laits fermentés (type yaourt) additionnés de l'huile de pépins de raisin au cours de la période post-fermentation (2 <sup>ième</sup> préparation).....	P.67

**Liste des tableaux:**

<b>Tableau 01</b> : Composition biochimique des pépins en pourcentage de poids frais (Cabanis et al .1998).....	P.8
<b>Tableau 02</b> : Composition en acides gras de l'huile de pépin de raisin (Lutterodt et al., 2011 ; Pardo et al., 2009).....	P.9
<b>Tableau 03</b> : Flavanols identifiés et répartition chez le pépin de raisin. Données provenant des pépins issus de marcs de raisin (Kammerer et al., 2004; Maier et al., 2009; Xu et al., 2010).....	P.11
<b>Tableau 04</b> : Comparaison des qualités d'huile de lin (sur 7 échantillons d'huile) et de pépins de raisin (sur 5 échantillons d'huile) en fonction des différents indices mentionnés.....	P.13
<b>Tableau05</b> : Constituants indésirables dans les huiles « brutes » éliminés au cours du raffinage (adapté de Pagès-Xatart-Parès (2008).....	P.17
<b>Tableau 06</b> : Comparaison des techniques d'extraction d'huile en terme de qualité, de rendement en huile et de consommation de solvant (adapté de Bouzrara, 2001 ;Muniglia et al., 2010, Latif, 2009 ; Willems, 2007).....	P.18
<b>Tableau 07</b> : Effet de la vitesse de rotation de la vis sur le rendement, la pression et la température pour différentes matières premières.....	P.22
<b>Tableau08</b> : Bactéries identifiées et aliments associés (Bourgeois et.al. 1996 ; Haeghebaert et al. 2002).....	P.28
<b>Tableau09</b> : Composition physicochimique du yaourt (Laurence et al.,2004).....	P.37
<b>Tableau10</b> : principaux caractères de Streptococcus thcrmophilus et lactobacillus bulgaricus (CORVI, 1997).....	P.38
<b>Tableau 11</b> : Rendement de l'huile extraite des pépins de raisin.....	P.57
<b>Tableau 12</b> : Le poids de mille graines (PMG).....	P.58
<b>Tableau13</b> : l'indice de refraction de l'huile de pépin de raisin.....	P.58
<b>Tableau 14</b> : Indices de réfraction de quelques huiles.....	P.59
<b>Tableau15</b> : le taux d'humidité et le % du poids sec de poudre de pépins de raisin.....	P.59
<b>Tableau16</b> : les polyphenols dans l'huile.....	P.60
<b>Tableau 17</b> : le taux des pigments dans l'huile de pépin de raisin.....	P.61
<b>Tableau 18</b> : Taux de polyphenols dans les graines de raisin.....	P.62
<b>Tableau19</b> : Résultats des diamètres des zones d'inhibitions des différentes huiles (l'huile de coloquinte, l'huile d'olive et l'huile de nigelle)( MOSTEFA-KARA Ikrame née BOUBLENZ A 2011).....	P.65

### Liste des abréviations :

**AG** : Acide gras.

**AGMI** : Acide Gras Mono-Insaturé.

**AGPI** : Acide Gras Poly-Insaturé.

**AGS** : Acide Gras Saturé.

**AFNOR** : Association Française de normalisation.

**AL** : Acide linoléique.

**AT** : Acidité titrable.

**CG** : Corps gras.

**CPG** : Chromatographie en Phase Gazeuse.

**°C** : degrés Celsius.

**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

**°D** : degrés Dornic.

**DLC** : Date limite de consommation.

**EAG** : Equivalent d'acide gallique.

**gr** : Gramme.

**HPLC** : Chromatographie liquide à haute performance.

**ISO** : Organisation internationale de normalisation.

**IR** : Infrarouge.

**INRAA** : Institut national de recherche agronomique d'Algérie.

**J** : Jour.

**mg** : Milligramme.

**M ± E** : Moyenne ± Ecart type.

**MG** : matière grasse.

**MeOH**: Méthanol.

**MS** : Matière sèche.

**n** : Nombre de doubles liaisons.

**nm** : Nanomètre.

**PMG** : Poids de mille graines.

**R** : Indice de réfraction.

**Rdt** : Rendement.

**SM** : Solution mère.

**T** : Température.

**TIAC** : Toxi-Infections Alimentaires Collectives.

**TPM** : **Tour** par minute.

**UFC** : Unité Formant la Colonie.

**V/V** : Volume sur Volume.

### Résumé :

Les plantes médicinales sont une importante source thérapeutique partout dans le monde. Leur consommation repose pour une bonne part sur la croyance populaire voulant que les produits qui en sont dérivés puissent être consommés en toute sécurité.

L'utilisation médicinale de plantes est une des pratiques thérapeutiques les plus anciennes.

Le consommateur que nous sommes se montre de plus en plus exigeant en termes de qualité : la sécurité alimentaire et les aspects nutritionnels sont au centre de préoccupations sociétales actuelles.

De tout temps, l'homme s'est intéressé aux lipides pour diverses utilisations : agroalimentaire, cosmétologie, médecine, ... etc. De nombreuses graines sont sources d'huiles, qui sont de plus en plus étudiées pour leurs propriétés nutritionnelles et thérapeutiques.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés en première partie à l'extraction de l'huile de pépins de raisin, nous abordons, après extraction, les différentes caractéristiques physico-chimiques de l'huile, en deuxième partie nous avons pu vérifier le pouvoir antibactérien de l'huile de pépins de raisin. De ce point de vue, l'huile de pépins de raisin ne présente pas l'activité attendue.

Et en troisième partie, de point de vue biochimique nous avons essayé de valoriser l'huile de pépins de raisin en l'incorporant dans le yaourt à des différentes concentrations afin de prolonger sa date limite de conservation (DLC), qui a été confirmé par les résultats obtenus.

Mots-clés: pépins de raisin, le pouvoir antibactérien, valorisation, conservation du yaourt.

### Summary :

Medicinal plants are an important therapeutic source around the world. Their consumption is largely based on the popular belief that products derived from them can be safely consumed.

The medicinal use of plants is one of the oldest therapeutic practices.

The consumer we are is becoming more and more demanding in terms of quality: food security and nutritional aspects are at the center of current societal concerns.

Man has always been interested in lipids for various uses: agribusiness, cosmetology, medicine, ... etc. Many seeds are sources of oils, which are increasingly studied for their nutritional and therapeutic properties.

In our work, we were interested in the first part in the extraction of grape seed oil, we approach, after extraction, the different physico-chemical characteristics of the oil, in the second part we were able to verify the power antibacterial grape seed oil. From this point of view, grape seed oil does not exhibit the expected activity.

And in the third part, from a biochemical point of view we tried to valorize grape seed oil by incorporating it into yogurt at different concentrations in order to extend its shelf life (DLC), which was confirmed by The obtained results.

**Keywords:** grape seed, antibacterial power, enhancement, yoghurt conservation.

خلاصة القول:

النباتات الطبية هي مصدر علاجي مهم في جميع أنحاء العالم. ويستند استهلاكها بشكل كبير إلى الاعتقاد الشائع بأن المنتجات المشتقة منها يمكن استهلاكها بأمان.

الاستخدام الطبي للنباتات هو واحد من أقدم الممارسات العلاجية.

لقد أصبح المستهلك الذي نتعرض له أكثر فأكثر من حيث النوعية: فالأمن الغذائي والجوانب التغذوية هي محور الاهتمامات المجتمعية الحالية.

لطالما كان الإنسان مهتمًا بالدهون للاستخدامات المختلفة: الأعمال الزراعية والتجميلية والطب ... إلخ. العديد من البذور هي مصادر للزيوت، والتي يتم دراستها بشكل متزايد لخصائصها الغذائية والعلاجية.

في عملنا، كنا مهتمين بالجزء الأول في استخلاص زيت بذور العنب، فإننا نقترّب، بعد الاستخلاص، من الخصائص الفيزيائية الكيميائية المختلفة للنفط، في الجزء الثاني تمكنا من التحقق من الطاقة زيت بذور العنب المضادة للبكتيريا. من هذا المنطلق، لا يظهر زيت بذور العنب النشاط المتوقع.

وفي الجزء الثالث، من وجهة نظر كيميائية حيوية، حاولنا تثمين زيت بذور العنب من خلال دمجها في اللبن بتركيزات مختلفة من أجل إطالة مدة صلاحيته (DLC)، والتي تم تأكيدها من قبل النتائج التي تم الحصول عليها.

الكلمات المفتاحية: بذور العنب، الطاقة المضادة للبكتيريا، التحسين، حفظ اللبن.

Liste des tableaux.	
Liste des figures.	
Liste des abréviations.	
Résumé	

## Sommaire

Introduction générale.....	1
<b>Chapitre I: Généralité sur le raisin</b>	
<b>I. Le raisin.....</b>	<b>3</b>
1. La structure et développement du raisin.....	3
2. Situation socio-économique du raisin.....	5
3. Les Proanthocyanidines une molécule d'intérêt thérapeutique dans le raisin.....	5
<b>II. Les pépins de raisin.....</b>	<b>7</b>
1. Morphologie et microstructure des pépins de raisin.....	7
2. Composition biochimique des pépins de raisin .....	8
3. Acides phénoliques.....	10
4. Flavanols.....	11
<b>III. L'huile des pépins de raisin.....</b>	<b>12</b>
1. Définition de la qualité d'une huile alimentaire.....	12
2. Critères de contrôle de la qualité d'une huile.....	12
3. Paramètres influençant la qualité d'une huile.....	14
4. Les procédés industriels de production d'huile végétale alimentaire.....	15
5. L'extraction de l'huile par solvant.....	18
6. Procédé de trituration.....	18
7. Spécificités de l'extraction de l'huile de pépins de raisin.....	23
8. Les avantages de l'huile de pépins de raisin pour l'alimentation.....	24
9. Les méthodes d'extraction de la matière grasse.....	24
<b>Chapitre II: Evaluation du pouvoir antibactérien de l'huile de pépin de raisin</b>	
1. Introduction.....	26
2. La source de contamination par des pathogènes et développement des micro-organismes dans Les aliments.....	27
3. Les principaux germes impliqués dans les toxi-infections ou les intoxications alimentaires et Les aliments associés.....	28
4. Les souches microbiennes.....	28
5. Les différentes méthodes d'évaluation du pouvoir antimicrobien des extraits des plantes.....	33
6. L'aromatogramme.....	34

## Chapitre III : Généralité sur le yaourt

1. Histoire.....	35
2. Définition.....	35
3. Composition du yaourt.....	35
4. Intérêt nutritionnel.....	36
5. Caractéristiques générales des bactéries lactiques.....	36
6. Comportement associatif des bactéries du yaourt.....	38
7. Rôle des bactéries du yaourt.....	38
8. Technologie du yaourt.....	39
9. Activité microbienne.....	40

## Partie expérimentale : Matériels et méthodes

### Partie A: étude comparative de deux différentes huiles de pépins de raisin.

I. Matériel végétal et préparation de la matière première.....	41
1. Matériel vegetal.....	41
2. Préparation de la matière première .....	42
2.1. Extraction d'huile par soxhlet et détermination de la teneur en matière grasse	
1. Extraction de l'huile par soxhlet.....	43
2. Détermination de la teneur en matière grasse et le poids de mille grains.....	43
3. Le taux d'humidité et le poids sec de la poudre de pepin de raisin.....	45
4. Caractérisation de l'huile et de graine de pépin de raisin.....	45
1. Indice de refraction.....	45
2. Dosage spectrométrique des phénols totaux de l'huile.....	46
3. Dosage spectrométrique des pigments dans l'huile.....	46
4. Dosage spectrométrique des phénols totaux de la graine.....	47
5. Pouvoir antioxydant: piégeage de radical libre DPPH de l'huile.....	49

### Partie B: Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile de pépins de raisin

1. Les souches utilisées.....	51
2. Isolement et purification.....	51
3. Inoculum.....	51

### Partie C: Préparation d'un yaourt étuvé (ferme).....

1. Le titrage d'acidité du yaourt.....	54
--	----

## Partie expérimentale: Résultats et discussion

1. La teneur en matière grasse (Rendement).....	55
2. Le poids de mille grains.....	56
3. Indice de réfraction.....	56
4. Le taux d'humidité et le poids sec.....	57

5. Dosage spectrométrique des phénols totaux dans l'huile.....	58
6. Dosage spectrométrique des pigments dans l'huile.....	58
7. Dosage spectrométrique des phénols totaux de la graine.....	59
8. Pouvoir antioxydant: piégeage de radical libre DPPH de l'huile.....	60
9. Evaluation du pouvoir antibactérien de l'huile.....	61
10. Evolution de l'acidité °D du yaourt additionné d'huile de pépins de raisin au cours de la période post-fermentation.....	63
<b>Conclusion</b> .....	66

ANNEXES

### Introduction :

Les huiles végétales constituent une denrée irremplaçable dont la consommation augmente pour cause de croissance démographique mondiale. Cette demande accrue d'huiles végétales, pour des applications tant industrielles qu'alimentaires.

Le monde prend de plus en plus conscience du potentiel médical et économique des ressources naturelles, qui fournissent les matières premières nécessaires pour le progrès de la pharmacologie, l'industrie cosmétique et agro-alimentaire (*Cheriti et al., 2011*). Les plantes sont depuis toujours une source habituelle de remèdes sous forme de préparations traditionnelles (*Djerrou, 2011*).

Ces huiles appartiennent à la catégorie des huiles insaturées, c'est-à-dire composées en majorité d'acides gras possédant une ou plusieurs doubles liaisons carbone-carbone. L'huile de lin est composée en majorité d'acides gras de type C18:3 (60% du total des acides gras) et celle issue du **pepin de raisin**, d'acides gras de type **C18:2** (60% du total des acides gras). Si les huiles insaturées présentent un intérêt nutritionnel certain, celles-ci sont en revanche très sensibles aux réactions d'oxydation, qui ont pour effet d'accélérer le rancissement de l'huile. Cette problématique peut être contournée par l'ajout d'antioxydants de manière à stabiliser l'huile. Les antioxydants de l'huile (de type polyphénols et tocophérols) sont naturellement présents dans les graines oléagineuses (*Natacha ROMBAUT.,2013*).

L'amélioration de la qualité de l'huile pourrait être obtenue par l'entraînement de composés antioxydants issus des graines (*Natacha ROMBAUT.,2013*).

La valorisation des ressources naturelles végétales passe essentiellement par l'extraction de leurs huiles. Ces dernières sont des produits à forte valeur ajoutée, utilisées dans divers domaines pour la fabrication d'une large variété de produits. L'utilisation d'huile dans l'industrie est déterminée par sa composition en acides gras, cette dernière varie selon l'origine végétale, les facteurs génétiques et les conditions climatiques (*Trabelsi et al., 2012*).

Vu l'importance de ces huiles végétales dans divers utilisations et afin de valoriser la biodiversité en termes de cette substance extraite des graines, et d'évaluer leurs activités antioxydante et antimicrobienne, nous nous sommes intéressés à l'huile de pepins de raisin (*Vitis vinifera L.*).

L'huile de pepin de raisin avait fait l'objet de beaucoup d'études antérieures (*Natacha Rombaut et al., 2015; Carla M. Peixoto et al.,2018; G.K. Jayaprakasha et al.,2001; Khalil Farhadi et al., 2016; Stefanie Bail et al.,2008*).

Cette filière a connu un essor important grâce à la découverte des vertus alimentaires, cosmétiques et thérapeutiques de cette huile. Ainsi nous cherchons par ce présent travail à démontrer que l'huile de pepins de raisin va avoir un effet antimicrobien sur certains bactéries pathogènes (c'est a dire notre objectif est de savoir si cette huile a un effet bactéricide ou bactériostatique) et à contrôler si cette

dernière a un effet sur la conservation de yaourt. Dans cette étude nous allons comparer deux variétés de raisin de deux différentes régions

D'autre part, les propriétés physico-chimiques et les activités biologiques des huiles végétales dépendent de plusieurs facteurs notamment de la région de récolte des fruits. Beaucoup de travaux ont été réalisés à l'échelle internationale sur l'huile à étudier.

Dans ce contexte, nous souhaitons savoir que les paramètres de qualité et les activités recherchées de nos échantillons seront comparables à ceux des autres travaux qui ont été réalisés?

Ce mémoire est constitué de deux parties:

- Une première partie, consacrée à une revue bibliographique, est constituée de trois chapitres:
  - ◆ Chapitre 01: Généralité sur le raisin (*Vitis vinifera L*) et d'une description de la morphologie et microstructure des pépins de raisin et leurs composition biochimique.
  - ◆ Chapitre 02: Evaluation du pouvoir antibactérien de l'huile de pépin de raisin.
  - ◆ Chapitre 03: Généralité sur le yaourt.
- Une deuxième partie est la partie pratique qui décrit :
  - ◆ Le matériel et méthodes consacrés à la détermination des caractéristiques physicochimiques et biologiques d'huile de pépins de raisin.
  - ◆ Les principaux résultats et leur discussion.

Ce travail se terminera par une conclusion tirée et les futures perspectives.

## I Généralité sur le raisin :

### 1. Le raisin :

Le raisin du genre *Vitis vinifera L* est la principale espèce de raisin cultivée, pour la production de vin. Cette espèce angiosperme, de la famille des Vitaceae, fournit en effet les principaux **cépages** ou cultivars (par exemple, Cabernet, Chardonnay, Muscat) utilisés pour la vinification.

Le raisin est une baie classée dans le groupe des fruits charnus à pépins. La grappe de raisin est constituée de deux parties : la rafle, qui en est la charpente et le fruit dit grain ou baie de raisin. Cette dernière se compose de trois constituants : la pellicule, la pulpe et les pépins de raisin. En général, la rafle représente de 3 à 6% de la grappe mûre, la baie en constitue de 94 à 97%. La pulpe représente 75 à 85% du poids des baies, les pellicules de 15 à 20% et les pépins de 3 à 6% (**Cabanis et al, 1998**).

### 2. La structure et développement du raisin :



**Figure 01:** représente la structure du raisin

*Article technique RFOE n°225(Pascal CHATONNET Ph.D)*

Les grains de raisins sont formés dans une grappe complexe. Les vignes sont reproduites essentiellement par greffage. En effet, elles ont été atteintes par un insecte, le Phylloxera qui parasitait les racines. Il s'est avéré que des vignes américaines (dont la qualité en raisin était inférieure) n'étaient atteintes par le phylloxera qu'au niveau des feuilles. Une très grande entreprise de rénovation des vignes a donc eu lieu. Elle a consisté à utiliser comme porte-greffe des vignes américaines (*Vitis rupestris* et *V. labrusca*) dont les racines sont résistantes et comme greffons des variétés de vigne

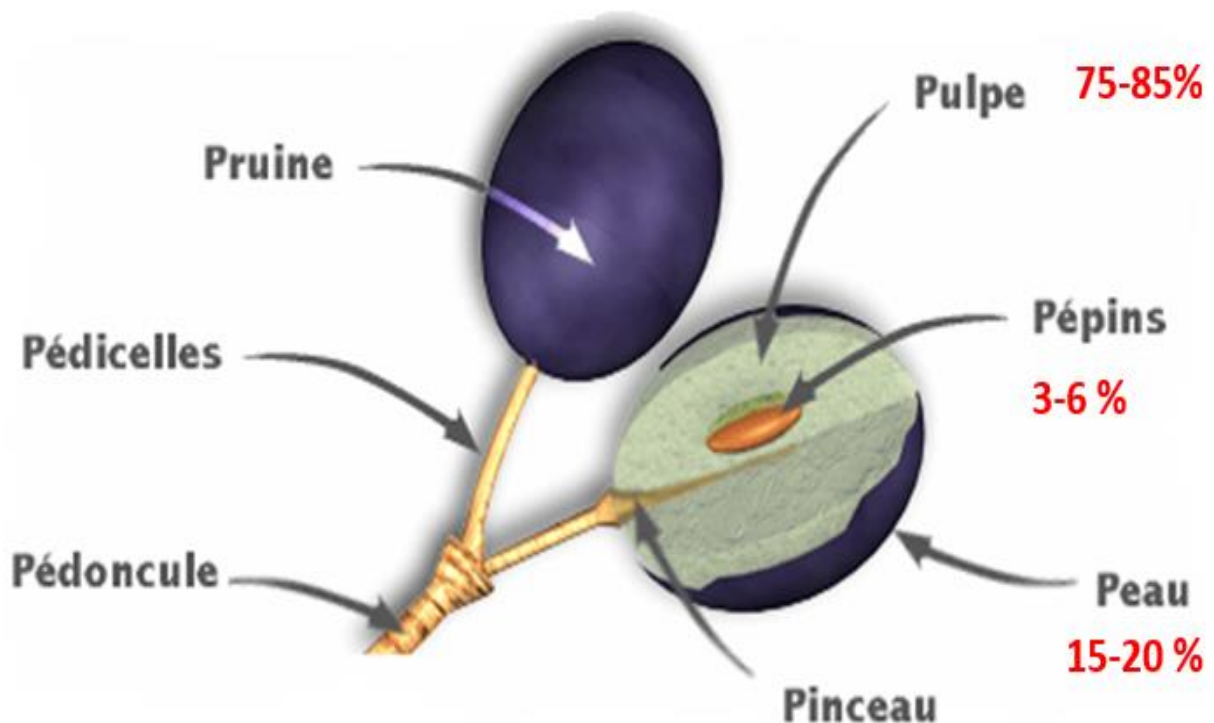
française (*Vitis vinifera*) aux qualités de raisin reconnues. L'ensemble du vignoble en France et dans le monde entier a été ainsi préservé.

➤ **Les variétés :**

Les cépages des variétés à vin (Cabernet, Chardonnay, Merlot, Sauvignon, etc.) sont utilisés seuls (vin de cépage) ou en mélange. Selon les méthodes de Vinification, on distingue les vins rouges, blancs, rosés et pétillants dont le fameux champagne.

➤ **L'utilisation :**

Les raisins de table sont consommés crus et peuvent permettre la fabrication de jus de fruits. Ils sont sélectionnés pour leurs qualités gustatives (saveur et consistance dans la bouche), Les raisins à vins (ou cépages de cuves) sont sélectionnés pour leur aptitude à la fermentation et à la fabrication du vin. Le vin est un jus fermenté complexe (fermentation alcoolique principale). A partir de cette première fermentation d'autres produits sont préparés (alcools et vinaigres).



**Figure 02** : représente les compartiments de la baie de raisin

*Article technique RFOE n°225(Pascal CHATONNET Ph.D)*

### 3. Situation socio-économique du raisin :

Le raisin est une culture mondiale majeure, avec une production de 68 millions de tonnes en 2010 (FAOSTAT, 2012). Les principaux pays producteurs de raisins sont l'Italie, la France, l'Espagne et les Etats-Unis. Les raisins sont utilisés à 80% pour la production de vin (Kammerer *et al*, 2004), les 20% restant sont principalement consommés en tant que raisin de table (Bail *et al.*, 2008).

Les résidus de raisin engendrés par le pressurage<sup>8</sup> sont appelés marcs de raisin et se composent en général de 3% de rafles, de 70 à 80% de pellicules et de résidus de pulpes et de 15 à 25% de pépins. Si le marc représente un déchet pour l'industrie viticole, il est considéré actuellement comme un co-produit de cette production (Schieber *et al*, 2001). Depuis que les propriétés antioxydantes des composés phénoliques contenus dans le marc ont été mises en évidence, un nombre croissant d'études a porté sur l'extraction et la purification de ces composés, ainsi que sur leur pouvoir nutritionnel (Bucić-Kojić *et al*, 2007; Gollucke et Ribeiro, 2012).

Les pépins de raisin présentent un potentiel de valorisation supplémentaire en comparaison aux autres éléments du marc, car ils contiennent de l'huile (de 8 à 20%, en base sèche).

En France, le principal triturateur de pépins est le groupe Grandes Huileries Mediacco (GHM), dont l'unité traite environ 50 000 tonnes de pépins de raisins par an. L'huile de pépin est utilisée à des fins alimentaires, mais trouve également d'autres applications non alimentaires telles que la cosmétologie, la savonnerie (savons liquides) et la lipochimie (production d'acides gras).

### 4. Les Proanthocyanidines une des principales molécules d'intérêt thérapeutique dans le Raisin:

Les pathologies ont un lien direct avec les radicaux libres, des molécules biochimiques instables entraînant des dégâts irréversibles au sein des cellules de l'organismes. Les antioxydants permettent de contrer les effets nocifs des radicaux libres. Or, notre alimentation nous en fournit bien trop peu. Ils sont localisés dans les peaux des fruits et des légumes, dans les cuticules qui recouvrent les pépins ou dans les graines. Ces parties sont généralement jetées car jugées à tort peu agréables à la consommation ou évacuées par l'organisme. Pour préserver votre santé, une supplémentation en extrait de pépins de raisin peut s'avérer être très utile. En effet, ce remède naturel contient un taux élevé d'oligo-proanthocyanidines. Ces flavonoïdes possèdent un intérêt nutritionnel et physiologique indéniable, du fait de leurs actions antioxydantes de 40 à 50 fois plus puissantes que la vitamine E, 18 fois plus puissantes que la vitamine C et 10 fois plus puissantes que la vitamine A. la raison est telle que les OPC concentrés dans les pépins de raisin sont particulièrement bien absorbés et métabolisés par le corps humain, aussi bien dans les milieux hydrosolubles et liposolubles, contrairement aux vitamines qui demeurent exclusivement solubles. Les OPC se diffusent à travers le corps en moins de soixante minutes. Leur longévité est de sept heures et passé ce délai, 50% de la dose originale agit encore

pleinement et demeure disponible dans le sang. Différemment des autres antioxydants, les OPC peuvent traverser la barrière des vaisseaux sanguins pour atteindre le cerveau, et ainsi neutraliser avec une efficacité optimale l'attaque de la plupart des radicaux libres associés au vieillissement biologique.

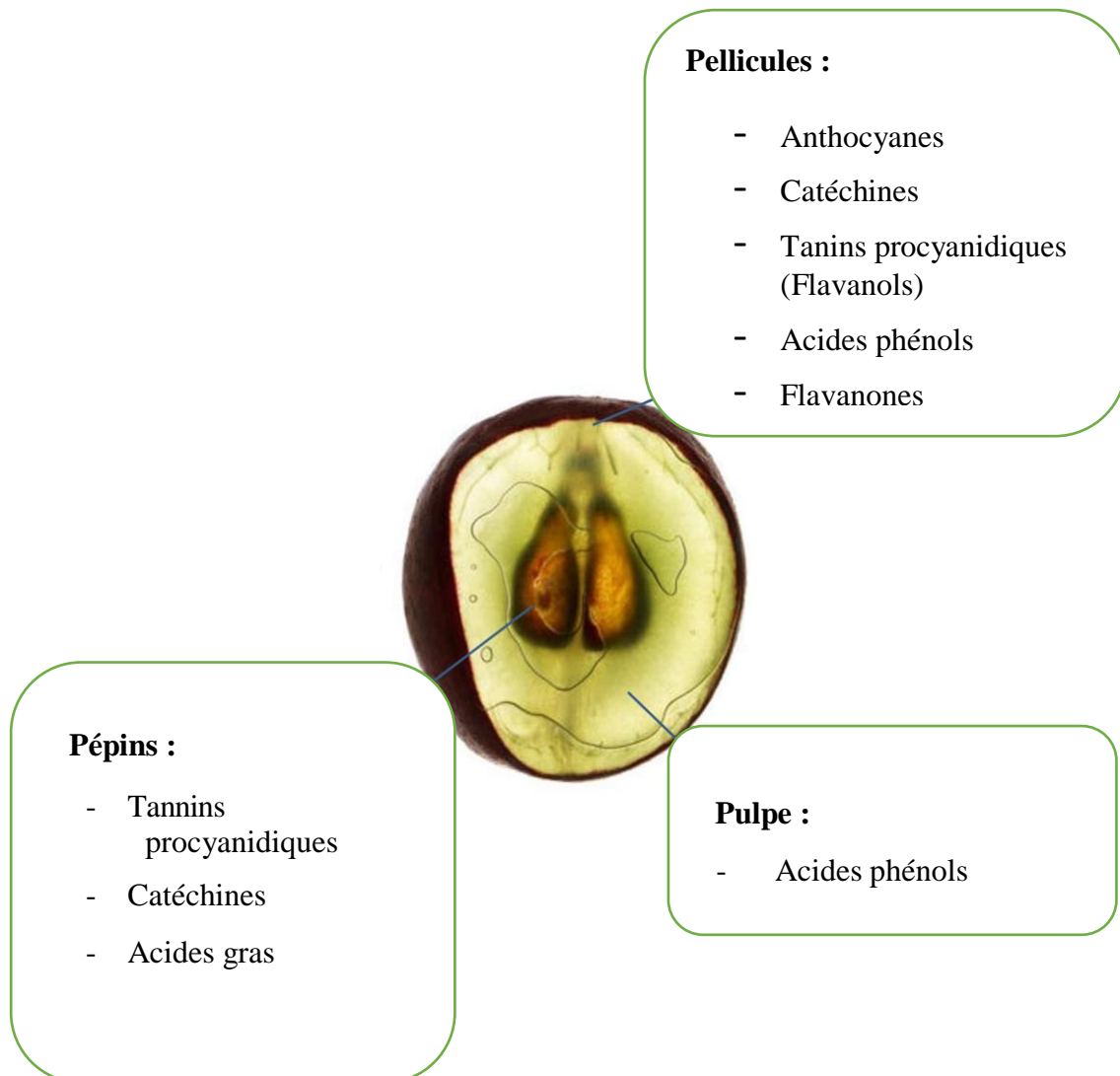
C'est une substance naturelle efficace pour prévenir et traiter de nombreuses maladies:

- **Les maladies cardiovasculaires:** les OPC abaissent le taux plasmatiques de LDL et augmente simultanément celui du HDL, protégeant ainsi les artères des dépôts gras. D'autre part, ces flavonoïdes empêchent l'accumulation des lipides dans les tissus.
- **Le diabète de type 2:** les OPC réduisent la concentration sanguine en sucre. L'augmentation chronique de la glycémie des personnes malades fragilise la paroi des vaisseaux sanguins qui finissent par devenir perméables.

Les Oligo-proanthocyanidines sont effectivement aptes à réparer les capillaires poreux et ainsi en améliorer leur résistance.

- **L'insuffisance veineuse:** les oligo-proanthocyanidines de pépins de raisin fortifient l'ensemble du système vasculaire. En effet, ils parviennent à se lier au collagène et inhiber l'action d'enzymes destructrices des collagenases.
- **Le cancer de la peau:** les OPC sont les plus puissants antioxydants de radicaux libres connus de nos jours, puisqu'ils possèdent des propriétés qui peuvent atténuer les effets sur la santé induits par les ultra-violet nocifs à la peau. En l'ajoutant à votre alimentation quotidienne, vous avez la faculté de protéger les tissus conjonctifs des dégâts causés par les radicaux libres.
- **Les maladies d'Alzheimer:** l'extrait de pépin de raisin représente un neuroprotecteur efficace pour prévenir les pertes cognitives dues à l'âge. En agissant dans l'hippocampe, les OPC parviennent à retarder le développement de la maladie d'Alzheimer en évitant l'accumulation des substances connues pour former les plaques cérébrales associées à un déclin progressif de la mémoire.

*(Cette étude a été publiée dans la revue scientifique: Nature; article: Bien choisir son extrait de pépins de raisin riche en OPC).*

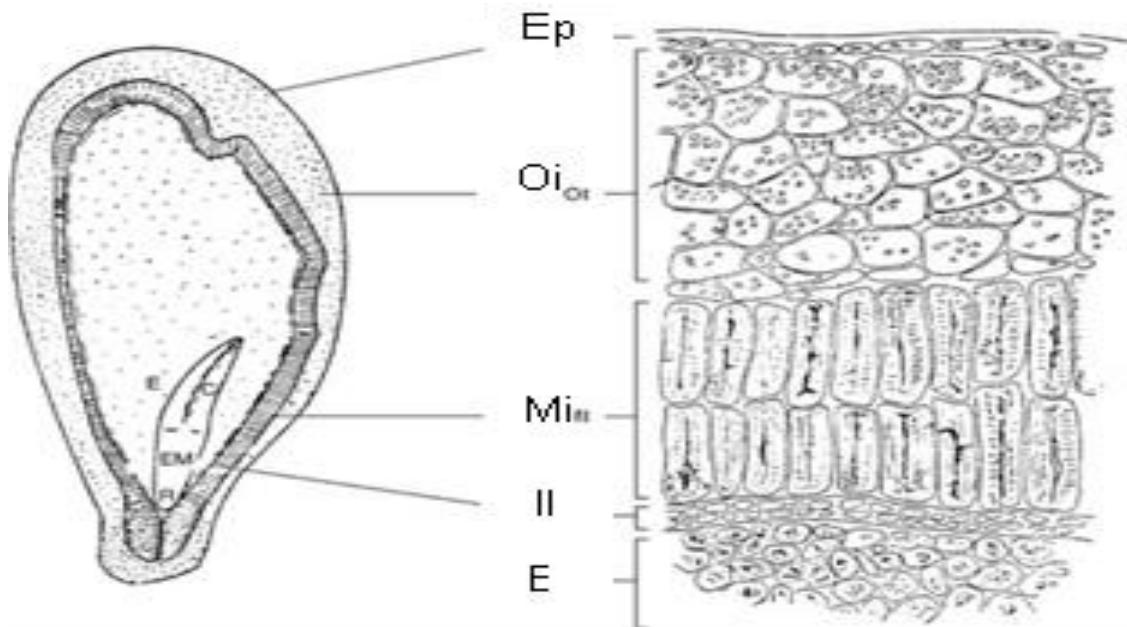


**Figure03:** représente la localisation des principales Molecules d'intérêt thérapeutique dans le raisin

## II Les pépins de raisin :

### 1. Morphologie et microstructure des pépins de raisin :

La structure histologique du pépin est présentée figure04. Le pépin de raisin fait partie des graines albuminées. Chaque pépin est composé d'un embryon entouré d'un albumen. L'ensemble des trois parties du tégument (interne, intermédiaire et externe) constitue la coque ligneuse du pépin, entourant l'albumen. Enfin, une fine cuticule constitue la dernière assise cellulaire du pépin. La couleur des pépins évolue du vert au marron au cours de leur développement (Cadot et al. 2006). Les modifications de couleur des pépins seraient dues à l'oxydation de composés phénoliques présents dans le tégument (Cadot et al. , 2006).



**Figure 04 :** Représentation du pépin de raisin et de ses structures cellulaires : C, cotylédons ; E, endosperme (albumen) ; EM, embryon ; Ep, épiderme ; II, tégument inférieur ; MI, tégument intermédiaire ; OI, tégument supérieur ; R, radicule (Levadoux, 1951; Ravaz, 1915)

## 2. Composition biochimique des pépins de raisin :

La composition biochimique globale des pépins matures est donnée dans le tableau 1

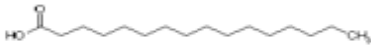
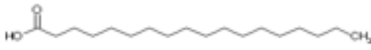


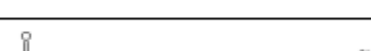
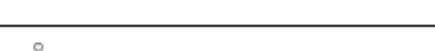
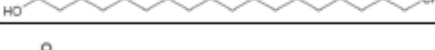
**Tableau 01 :** Composition biochimique des pépins en pourcentage de poids frais (Cabanis et al. 1998)

Composé	%
Eau	25 – 45
Composés glucidiques	34 – 36
Lipides	8 – 13
Polyphénols (tanins)	4 – 10
Composés azotés	4 - 6,5
Minéraux	2 – 4

A l'exception des polysaccharides qui se répartissent dans tous les tissus du pépin, les autres composés ont des localisations tissulaires spécifiques ; par exemple, les protéines sont exclusivement localisées dans l'albumen, de même que les lipides.

L'huile est localisée dans l'albumen des pépins et possède une répartition spécifique d'acides gras, à dominante linoléique, indiquée dans le tableau 2.

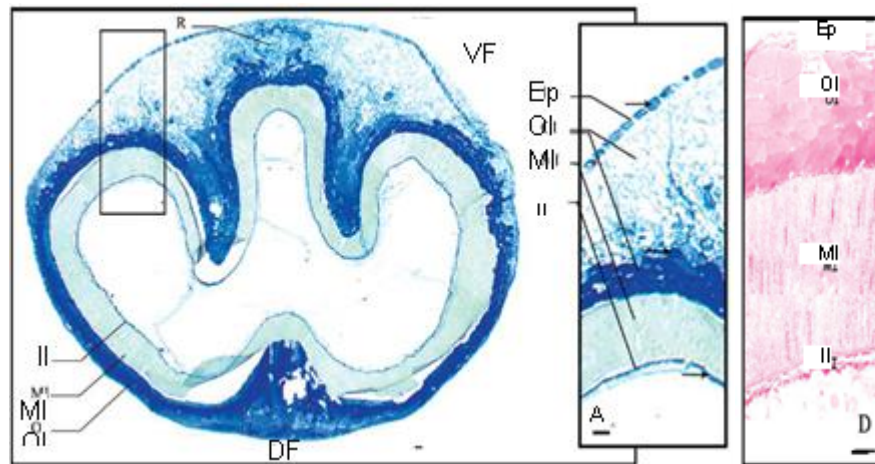
**Tableau 02:** Composition en acides gras de l'huile de pépin de raisin (Lutterodt et al., 2011; Pardo et al., 2009)

Nom commun de l'acide gras	Nomenclature biochimique	Formule semi-développée	Répartition (%)
Acide palmitique	C16:0		7 - 9
Acide stéarique	C18:0		2 - 6
Acide oléique	C18:1 ω9		13 - 24
Acide linoléique	C18:2 ω6		60 - 75
Acide α- linoléique	C18:3 ω3		0 - 2
Acide arachidique	C20:0		0,15 - 0,59
Acide arachidonique	C20:4		

L'huile de pépins contient également des **tocophérols** à raison de **0,5 à 0,7 g/kg** (Flanzy, 1998). Des **polyphénols** ont été quantifiés dans l'huile de pépins, allant jusqu'à **115 mg Equivalent Acide Gallique<sup>10</sup>/kg** d'huile.

La protection mécanique de l'albumen est assurée par le tégument du pépin. Cette partie rigide est composée en grande partie de lignine. Ce composé phénolique structural, présente la particularité d'être uniquement présent au niveau du tégument intermédiaire chez le pépin de raisin (figure05) (Cadot *et al.*, 2006). Cette molécule a pour fonction de conférer une résistance mécanique à la paroi végétale pour la protection du contenu cellulaire. Dans le pépin, la lignine est responsable de la dureté de la graine, et constitue une barrière à l'oxydation. Les polyphénols du pépin, les tanins et flavan-3-ols, sont majoritairement présents au niveau du tégument interne et du tégument externe jusqu'à la cuticule (figure 05).

Une faible proportion de ces polyphénols (6%) a été localisée dans l'albumen (Xu *et al.*, 2010

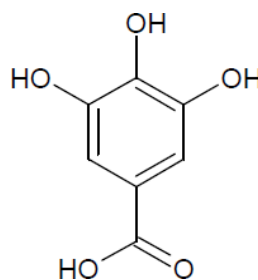


**Figure 05:** Localisation des composés phénoliques du pépin. Photographie d'une coupe de pépin à 123 JAF (jours après floraison), avec une coloration des tanins au DMACA<sup>11</sup> (A) et des flavan-3-ols à la vanilline-HCl<sup>12</sup> (B). VF = face ventrale, DF = face dorsale, II = tégument interne, MI = tégument intermédiaire, OI = tégument externe, R = radicule, Ep = épiderme (extrait de Cadot et al., 2006)

Plusieurs familles de polyphénols sont présentes chez le pépin: les acides phénoliques simples, les flavanols et des formes condensés des polyphénols (tanins). Ces composés permettraient une restriction des échanges gazeux avec le milieu extérieur et un rôle protecteur vis-à-vis des insectes et champignons (Cadot et al., 2006). Les polyphénols étant des métabolites secondaires, leur quantité et répartition dans le pépin dépendent en grande partie du site de production des raisins, du lieu et de l'année de récolte (conditions climatiques de culture), du cultivar ainsi que du degré de maturité des pépins (Shi et al., 2003).

### 3. Acides phénoliques :

Cette catégorie de molécules regroupe les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (acide gallique) et hydroxycinnamique (acide caféique). Le représentant de cette famille de polyphénols dans le pépin de raisin est l'acide gallique, dont la structure chimique est indiquée ci-dessous. L'acide gallique est rarement présent sous forme libre (figure 06), il est le plus souvent estérifié à un flavanol (figure 07, tableau 03) (Flanzy, 1998).

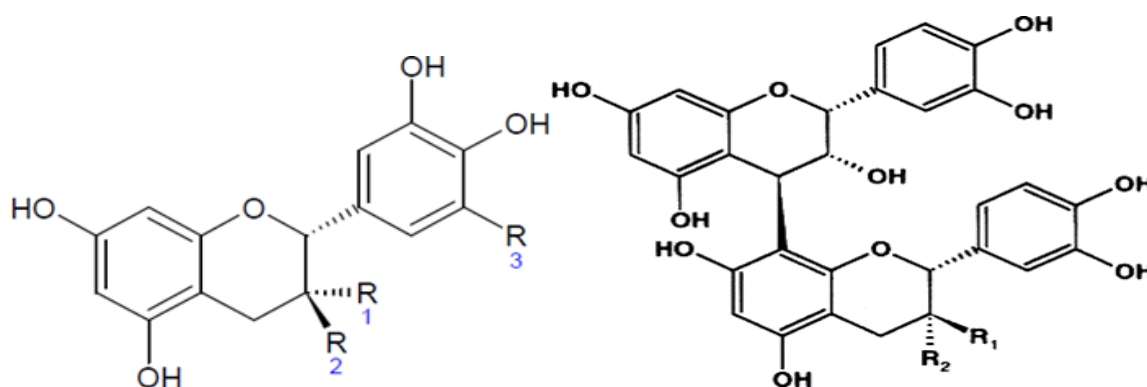


**Figure 06:** Structure de l'acide gallique

## 4. Flavanols :

Les flavanols appartiennent à la catégorie des flavonoïdes, caractérisés par un squelette de base à 15 atomes de carbone (C3-C6-C3) de type 2-phényl benzopyrone (Flanzy, 1998).

Les principaux flavonoïdes retrouvés dans le pépin sont les **flavan 3-ols** dont la structure chimique générale est présentée figure 4 et tableau 1-6. Les flavanols sont présents sous forme libre ou estérifiée à l'acide gallique et sont les unités monomériques constitutives des formes polymérisées appelées proanthocyanidines ou tanins condensés. Ces formes condensées sont également présentes également chez le pépin. Les proanthocyanidines sont présents sous forme de dimères ou de trimères et plus rarement à des degrés de polymérisation supérieurs (Shi *et al.*, 2003).



**Figure07:** Structure des principaux flavanols chez le pépin (unités monomérique à gauche et procyanidines dimériques à droite)

Degré de polymérisation et répartition dans le pépin	Type	R1	R2	R3
Monomères (59 ± 11 %)	catéchine	H	OH	H
	gallocatéchine	H	OH	OH
	epicatéchine	OH	H	H
	épigallocatéchine	OH	H	OH
Dimères (37 ± 7 %)	procyanidine B1	OH	H	-
	procyanidine B2	H	OH	-

**Tableau 03:** Flavanols identifiés et répartition chez le pépin de raisin. Données provenant des pépins issus de marcs de raisin (Kammerer *et al.*, 2004; Maier *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010)

En agroalimentaire, les polyphénols sont utilisés en tant que **colorants et conservateurs**, où ils sont incorporés dans les produits de consommation. Un de leur principal intérêt repose sur leur fonction

d'antioxydants. Ces fonctions deviennent intéressantes lorsqu'on s'intéresse à la conservation des huiles, plus particulièrement lorsqu'elles possèdent un degré d'insaturation important.

### III L'huile des pépins de raisin

#### 1. Définition de la qualité d'une huile alimentaire:

De manière générale, la qualité est définie comme étant « la combinaison des attributs ou des caractéristiques d'un produit qui ont une signification en déterminant le degré d'acceptabilité de ce produit par l'utilisateur » (Gould, 1992). Les huiles végétales alimentaires peuvent être différenciées suivant le procédé d'obtention des huiles et leur degré de raffinage. On distingue ainsi selon le Codex Alimentarius (1999) :

- **Les huiles vierges**, obtenues par pressage combiné éventuellement à un chauffage externe et dont le raffinage est limité à des procédés physiques (décantation, filtration et centrifugation).
- **Les huiles obtenues par pressage à froid**, se différenciant des huiles vierges uniquement par l'absence de chauffage pendant le procédé d'extraction mécanique.
- **Les huiles raffinées**: après extraction par un procédé mécanique ou par solvants, l'huile subit un ensemble d'opérations visant à en éliminer les composés indésirables, pour produire une huile correspondant à un cahier des charges.

La qualité des huiles alimentaire est caractérisée par leurs propriétés physiques (Shahidi, 2005), nutritionnelles, organoleptiques et sensorielles. Cependant, un des principaux aspects qualitatif d'une huile s'attache à sa composition ainsi qu'à sa stabilité oxydative.

L'oxydation entraîne l'apparition d'odeurs et composés indésirables rendant l'huile impropre à la consommation (Choe et Min, 2006).

#### 2. Critères de contrôle de la qualité d'une huile:

Les critères de contrôle de la qualité d'une huile, en terme de composition, incluent le profil en acides gras des huiles, la teneur en composés antioxydants (type tocophérols et polyphénols) ainsi que les marqueurs d'altération de l'huile. Les indicateurs fréquemment utilisés pour l'évaluation des altérations de l'huile sont (Ollé, 2002):

- **L'indice d'acide**: mesure qui évalue l'altération hydrolytique des corps gras. La présence d'eau (dans les graines ou dans le milieu) peut entraîner des phénomènes d'hydrolyse des huiles, soit par une action chimique ou enzymatique (Frega et al., 1999; Ollé, 2002). Les triglycérides sont alors partiellement hydrolysés en acides gras libres. Le Codex Alimentarius (1999) fixe la valeur de l'indice acide à un maximum de **4 mg KOH/g d'huile** pour les huiles vierges et pressées à froid.

- **L'indice de peroxyde:** mesure permettant d'évaluer l'état d'oxydation d'une huile. Cet indice a pour objectif le dosage de l'oxygène chimiquement actif contenu dans un gramme de corps gras. Le Codex Alimentarius (1999) fixe la valeur de l'indice peroxyde à un maximum de **15 méq O<sub>2</sub>/kg d'huile** pour les huiles vierges et pressées à froid.
- **L'indice de para-anisidine:** quantifie les composés aldéhydiques responsables des odeurs de rance des huiles. (Brühl et al., 2007).

Ces deux derniers indices permettent d'évaluer un état d'oxydation de l'huile au moment du dosage. Cependant, il est tout aussi intéressant de caractériser la résistance à l'oxydation de l'huile.

L'oxydation d'une huile peut survenir durant le procédé d'extraction et au cours de la conservation des huiles. Les réactions d'oxydation conditionnent ainsi la durée d'utilisation optimale d'une huile (Ollé, 2002). La résistance à l'oxydation peut être déterminée par des tests de vieillissement accélérés (Test de Swift, test de Schaal, Rancimat ou par analyse Calorimétrique Différentielle à Balayage). La résistance à l'oxydation y est souvent déterminée par la mesure du temps d'induction à l'oxydation.

**Tableau 04:** Comparaison des qualités d'huile de lin (sur 7 échantillons d'huile) et de pépins de raisin (sur 5 échantillons d'huile) en fonction des différents indices mentionnés

Composés	Unités	Huile de lin pressée à froid (Choo <i>et al.</i> , 2007)	<b>Huile de pépins de raisin</b> pressée à froid (Pardo <i>et al.</i> , 2009)
Indice acide	(mg KOH/g)	0,5 – 2,5	0,4 – 1,5
Indice peroxyde	(méq O <sub>2</sub> /kg)	< 3	6,0 – 13,5
Indice de p-anisidine	( - )	0,36 – 0,74	ND
Stabilité oxydative de l'huile	(h)	ND	6,36 – 9,36 (à 98°C et sous un débit de 10L/h d'air)

ND = non déterminé

Le tableau 4 illustre les différences qualitatives des huiles de lin et de pépins de raisin obtenues après un pressage à froid. L'huile de lin satisfait aux valeurs maximales fixées par le Codex Alimentarius pour les valeurs d'indice acide et peroxyde. L'huile de pépins de raisin possède un indice peroxyde plus élevé (compris entre 6,6 et 13 méq O<sub>2</sub>/kg d'huile) que celle de l'huile de lin. Matthäus (2008) a mis en évidence que les composés volatils tels que l'éthanol, l'acétate d'éthyle et l'hexanal apparaissent rapidement au cours du stockage d'huile vierge de pépin. Ces composés se développent d'autant plus rapidement que la qualité des pépins est moindre avant pressage. L'auteur préconise donc un séchage rapide des pépins après pressage pour minimiser la dégradation des pépins et ainsi assurer une qualité maximale de l'huile.

### 3. Paramètres influençant la qualité d'une huile:

La principale altération à laquelle est sujette l'huile est l'oxydation, qui peut être accélérée par différents facteurs: la composition de la graine, de l'huile ainsi que les conditions de stockage de l'huile et d'emballage.

#### - La composition de la graine et de l'huile:

Le degré d'insaturation des acides gras est le principal facteur qui conditionne la stabilité des huiles. Plus les huiles sont riches en acides gras insaturés, plus l'huile sera sensible à l'oxydation (Parker *et al.*, 2003). Plusieurs composés présents dans l'huile ont un effet promoteur de l'oxydation tels que les **acides gras libres**, les **métaux** et la **chlorophylle** (Choe, 2008).

Les composés antioxydants vont à l'inverse augmenter la stabilité oxydative des huiles. La présence **des antioxydants** augmente le temps d'induction à l'oxydation ou **ralenti la vitesse d'oxydation** (Choe et Min, 2006).

La famille des tocophérols est le principal antioxydant de l'huile. Les polyphénols appartiennent également aux antioxydants, cependant leur faible quantité dans l'huile les rend moins efficaces que les tocophérols.

#### - Les conditions de conservation de l'huile:

Durant le stockage de l'huile, plusieurs facteurs contribuent à dégrader l'huile (List et al., 2005). D'une part, **l'exposition de l'huile à la lumière** favorise la formation de **radicaux libres**, initiateurs de réactions radicalaires en chaîne.

D'autre part, **la température** de conservation de l'huile joue un rôle majeur dans la dégradation de l'huile. Ainsi, une augmentation de la température de l'huile de 21°C à 49°C, au terme de 7 semaines de stockage induit une augmentation de l'indice peroxyde de 8 à 100 méq O<sub>2</sub>/kg d'huile pour l'huile de soja raffinée (Going, 1968). Les auteurs attribuent cet effet négatif de la température à l'augmentation de la vitesse de dissolution de l'oxygène situé à l'interface air-huile.

Une augmentation de la surface d'huile disponible à l'oxygène engendre également une augmentation linéaire de l'indice peroxyde (Going, 1968).

4. Les procédés industriels de production d'huile végétale alimentaire:

Les procédés d'extraction d'huile à partir des graines oléagineuses:

Trois procédés sont classiquement utilisés pour extraire l'huile à partir des graines oléagineuses: la pression unique ou double, l'extraction directe par solvants et le procédé mixte, couplant le pressage à une extraction par solvant sur le tourteau (Dijkstra et Segers, 2007). Le procédé global d'extraction d'huile pour les graines oléagineuses de type colza et lin est présenté dans la figure08.

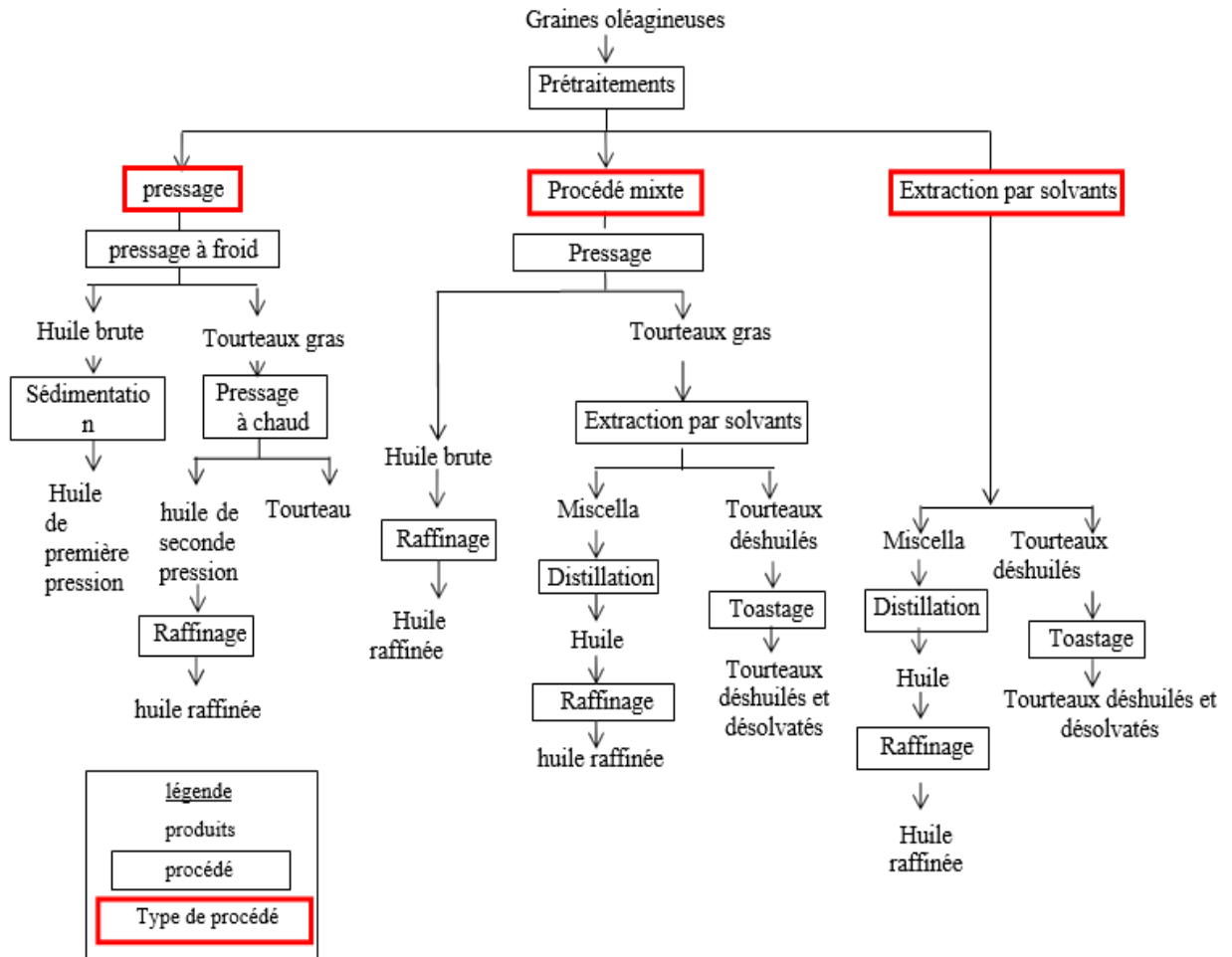


Figure08: Procédés classiques d'extraction d'huile à partir de graines oléagineuses, adapté de Gros (2005)

La préparation des graines comprend plusieurs étapes (Anderson, 2005). Les graines sont préalablement nettoyées et éventuellement séchées (lorsque les graines ont une humidité supérieure à 10%). Afin de faciliter l'extraction de l'huile, les graines peuvent subir différents prétraitements. Ceux-ci peuvent être de nature physique, thermique ou visent à modifier l'humidité de la matière première.

Les prétraitements les plus fréquemment utilisés avant pressage sont la cuisson, le floconnage ou l'aplatissage des graines. Un depelliculage des graines est parfois utilisé (plus particulièrement pour les graines de tournesol ou soja) soit pour faciliter le pressage des graines (Dijkstra et Segers, 2007) ou dans une optique nutritionnelle (par exemple, pour l'amélioration de la digestibilité des tourteaux, Matthäus, 2012).

Les prétraitements ont pour objectif de préparer les graines à la principale opération de séparation liquide-solide: le pressage. Le pressage se définit comme le procédé physique permettant l'exsudation de l'huile d'une matière poreuse sous l'effet d'une force de compression (Schwartzberg, 1997). Industriellement, les presses à vis sont utilisées pour permettre un traitement en continu des graines. Ce type de presse est composé d'une vis sans fin tournant dans un fourreau présentant des barreaux ou perforations (suivant les modèles de presses) pour permettre la sortie de l'huile. Une restriction, nommée filière ou cône obturateur, située à l'extrémité de la vis (ou zone de décharge) permet de générer une pression suffisante pour exsuder l'huile contenue dans les graines (Dijkstra et Segers, 2007). Le pressage est réalisé à froid ou à chaud. Dans le cas où le pressage est réalisé à froid, c'est-à-dire sans chauffage externe, la température de l'huile extraite peut atteindre jusqu'à 112°C (Vadke et Sosulski, 1988). La température générée durant le pressage provient de la dissipation de chaleur engendrée par les forces de friction mises en œuvre dans la presse (Kemper, 2005). Le pressage peut également être assuré en discontinu par pressage hydraulique, cependant ce mode de pressage est limitée à un certain type d'oléagineux (olives, cacao; Dijkstra et Segers, 2007). A l'issue de l'étape de pressage, le tourteau obtenu est qualifié de « gras », sa teneur en huile résiduelle étant de l'ordre de 10 à 20% (Matthäus, 2012).

L'huile brute de pressage contient des particules nommées fines ou pieds de presse (particules co-extraites lors du pressage). Ces solides sont séparés de l'huile en deux étapes. La séparation des plus grosses particules est réalisée par sédimentation dans un « *screening tank* ». L'huile de première pression obtenue est ensuite filtrée ou clarifiée dans un décanteur pour éliminer les particules résiduelles plus fines (Dijkstra et Segers, 2007). Les pieds de presses sont récupérés et ajoutés au tourteau gras pour être pressés à nouveau afin de récupérer l'huile qu'ils contiennent. A l'issue de ce second pressage, l'huile brute obtenue est qualifiée de seconde pression.

Plusieurs voies de valorisation des tourteaux sont possibles. D'une part, l'huile contenue dans les tourteaux gras peut-être extraite par des solvants organiques, afin de maximiser le rendement global d'extraction d'huile (figure 1-12). D'autre part, les tourteaux conservent des avantages nutritionnels, de par leur teneur en protéines et profil en acide gras de l'huile, ce qui les rend intéressant pour l'alimentation animale. Si l'huile de première pression peut-être vendue en tant que telle, les huiles de seconde pression et extraites par solvant doivent être raffinées. En effet, des composés liposolubles

indésirables (phospholipides, métaux...) sont co-extraits avec l'huile. Les opérations de raffinages des huiles sont synthétisées dans le tableau 5

Opération de raffinage chimique	Nature des constituants éliminés	Pourcentage ou teneur	Origine	Inconvénient de leur présence
Démucilagination	Phospholipides	0,2 à 1,8%	Constituant naturel	- Aspect trouble - Brunissement - Instabilité organoleptique
Neutralisation chimique et lavages	Acides gras libres	0,3 à 5%	Constituants naturels libérés par hydrolyse	- Goût - Hydrolyse - Instabilité organoleptique
	Métaux (fer, cuivre)	de l'ordre du mg/kg	Constituants naturels Contamination	- Catalyseurs d'oxydation
	Produits d'oxydation	selon la matière première	Auto-oxydation	- Instabilité organoleptique - Couleur - Odeurs
Décoloration	Pigments	de l'ordre de 10 mg/kg	Constituants naturels	- Couleur, - Instabilité organoleptique
Décirage	Cires	de l'ordre de 100 mg/kg	Constituants naturels	Aspect trouble
Désodorisation	Contaminants	de l'ordre de 10 mg par tonne	Contamination	Hygiène alimentaire
	Composés Volatils	< 0,1%	Naturel Auto-oxydation	Odeurs, goût

**Tableau05:** Constituants indésirables dans les huiles « brutes » éliminés au cours du raffinage (adapté de Pagès-Xatart-Parès (2008))

Parmi les étapes de raffinage, la neutralisation chimique (visant principalement à l'élimination des acides gras libres) est l'opération générant le plus de sous produits (pâtes de neutralisation, effluents aqueux) dont le re-traitement est coûteux. Le raffinage physique est alors une alternative au traitement chimique (Pagès-Xatart-Parès, 2008). Cependant les conditions drastiques de ce traitement ne conviennent pas pour les huiles présentant une instabilité thermique.

### 5. L'extraction de l'huile par solvant:

L'extraction de l'huile par solvants est le procédé le plus utilisé, après l'extraction par pressage. Actuellement, l'hexane est le solvant d'extraction préférentiellement utilisé, cependant l'inflammabilité de ce composé, sa toxicité et son prix indexé à celui du pétrole sont des inconvénients majeurs de son utilisation (Johnson, 2002). Le potentiel d'extraction d'huile par des solvants

alternatifs tels que l'éthanol (Ferreira-Dias *et al.*, 2003), l'iso- propanol (Zhang *et al.*, 2002), l'iso-hexane (Wan *et al.*, 1995) et l'heptane (Gandhi *et al.*, 2003) a été étudié ces dernières années. Cependant le CO<sub>2</sub> supercritique est le solvant ayant fait l'objet de recherches intensives ces vingt dernières années car le produit final ne contient pas de solvants résiduels (Dunford, 2004).

Le tableau 6 synthétise les avantages qualitatifs et quantitatifs des différentes techniques d'extraction d'huile.

Procédé d'extraction	Rendement d'extraction	Qualité de l'huile*	Séparation solvant/huile	Consommation de Solvant (kg solvant/kg d'huile)
Enzymatique	-	+	-	De 1 à 25
solvants organiques	+	-	+/-	2
Pressage mécanique continu	+	+	+	0
Pressage hydraulique	-	+	+	0
CO <sub>2</sub> supercritique	+	+	+	100

**Tableau 06:** Comparaison des techniques d'extraction d'huile en terme de qualité, de rendement en huile et de consommation de solvant (adapté de Bouzrara, 2001 ;Muniglia *et al.*, 2010, Latif, 2009 ; Willems, 2007)

\*La qualité de l'huile est définie ici selon les indicateurs qualités et par la présence de particules dans l'huile.

## 6. Procédé de trituration:

Le pressage est la principale opération unitaire d'extraction de l'huile contenue dans les graines. Les premières presses utilisées en huilerie étaient les presses hydrauliques, où l'huile est exsudée de la matière première à presser sous l'effet d'une force uniaxiale. Les presses à vis, assurant un pressage en continu des graines, sont apparues en huileries vers 1900 avec les presses Anderson (Williams, 2005). En plus d'une pression mécanique exercée sur les graines, celles-ci subissent des contraintes de cisaillement, ce qui permet d'obtenir des rendements plus importants en comparaison au pressage hydraulique.

Actuellement, la presse à vis est principalement utilisée en huilerie, l'utilisation des presses hydrauliques reste limitée à un certain type de matières premières (cacao, olives). Pour cette raison, le pressage à vis sera étudié comme procédé de référence. Après une rapide description des équipements existants utilisés pour le pressage en continu, l'influence des paramètres opératoires sur les performances du pressage continu sera décrite dans la partie suivante.

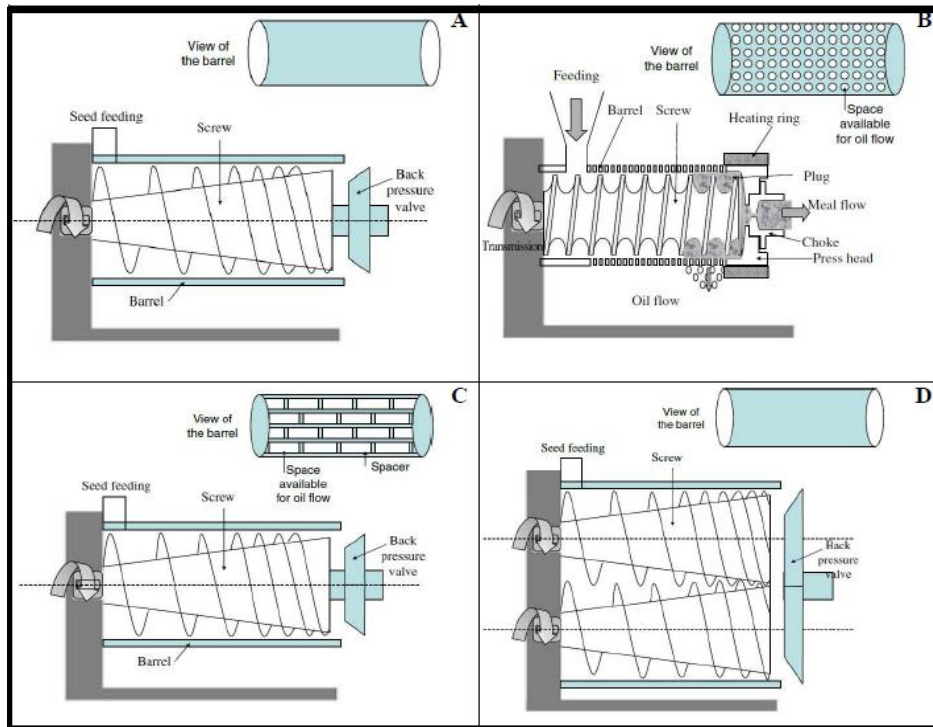
### 6.1. Equipements de pressage continu (Savoire, 2008):

Les presses continues peuvent être classées en trois catégories:

- Les expandeurs,
- Les expellers,
- Les systèmes bivis.

Les expandeurs se rapprochent des extrudeurs dans le sens où les graines sont triturées mais sans extraction d'huile. La vis est contenue dans un système fermé (A, figure 09) dans lequel des piquages réguliers sont faits pour permettre l'injection d'eau ou de vapeur. Ce mode de trituration des graines vise surtout à une préparation des graines avant une seconde étape d'extraction mécanique ou par solvants (principalement pour les graines à faible teneur en huile; type soja ou coton). Néanmoins, certains modèles présentent en fin de vis une zone d'extraction d'huile rendant possible le traitement de graines riches en huile puisque les pellets obtenus ont des teneurs en huile de 30 à 35% (Johnson, 2000).

Les expellers sont les presses à vis les plus fréquemment rencontrées en industrie. Ces équipements sont constitués d'une vis sans fin tournant dans un fourreau perforé ou à barreaux pour permettre l'écoulement de l'huile. Au niveau de la tête de vis, une restriction (assurée par un disque obturateur ou par une filière) obstrue partiellement la zone de décharge du tourteau provoquant une augmentation de pression nécessaire à l'exsudation de l'huile. Selon les vis utilisées, on distingue deux types de presses. Celles présentant des pas de vis et diamètres constants (B, figure 09), et celles ayant des pas de vis et des sections variables (C, figure 09). Les premières ont plutôt une utilisation artisanale alors que la seconde catégorie est retrouvée en industrie. Les systèmes bivis sont principalement des extrudeurs dont l'utilisation commence à se développer. L'intérêt de ce type d'appareil réside dans l'arrangement des vis (D, figure 09) qui peut permettre un traitement thermomécanique des graines et ainsi éviter les étapes de prétraitement. Les études de faisabilité à l'échelle pilote réalisées avec un extrudeur bivis montrent de bons résultats en terme de rendement d'extraction (70 à 94% ; Guyomard, 1994, Kartika, 2006). Cependant actuellement, le pressage bivis pour l'extraction d'huile n'est pas utilisé industriellement (Pagès-Xatart-Parès, 2008).



**Figure 09** : Configurations des trois catégories de presses continues : expandeur (A), expeller (B et C) et presse bivis (D) (Savoire et al. 2012)

## 6.2. Influence des paramètres opératoires sur les performances du pressage continu:

Selon Jacobsen et Backer (1986), les performances d'une presse continue sont principalement définies par:

- La capacité: la quantité de graines pressées par unité de temps;
- Le débit d'huile: la quantité d'huile produite par unité de temps;
- L'efficacité d'extraction ou rendement: le ratio de la quantité d'huile extraite sur la quantité d'huile disponible dans les graines. La notion de teneur en huile résiduelle dans le tourteau est également employée pour caractériser l'efficacité du pressage.

Les performances d'une presse continue dépendent de variables indépendantes, telles que la vitesse de rotation de la vis, le diamètre de la restriction située à l'extrémité de la zone de décharge et pour les presses à vis modulables, la configuration de la vis. Selon la matière première triturée, le préchauffage de la presse est un paramètre à prendre en compte lors du pressage.

Bien que l'effet des variables indépendantes sur les performances du pressage à vis soit décrit dans la littérature, il est difficile de comparer toutes les données entre elles. D'une part, les différentes études paramétriques du pressage sont réalisées sur des matières premières différentes donc présentant des caractéristiques morphologiques différentes (par exemple, colza: Vadke et Sosulski, 1988 ; chia : Martinez *et al.*, 2012 ; jatropha : Karaj et Müller, 2011). D'autre part, les configurations des équipements de pressage utilisés diffèrent. Enfin les modalités des paramètres établis (vitesse de

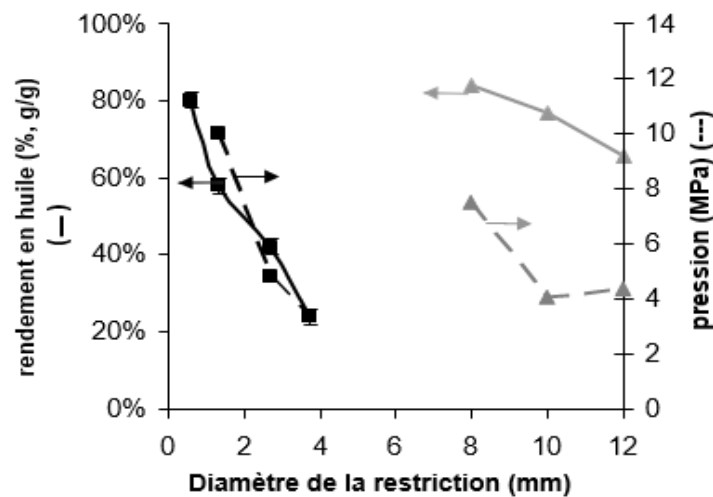
rotation de la vis, diamètre des restrictions, préparation des graines) pour les études sur le pressage varient également. Il est néanmoins possible d'évaluer les tendances globales des effets des paramètres opératoires.

- **Préchauffage de la presse:**

Le démarrage d'une presse est l'étape critique du pressage à vis. Les premières minutes du pressage correspondent à l'étape de stabilisation de la presse (préliminaire à l'état stationnaire de pressage). Il peut survenir un blocage de la presse durant cette phase de stabilisation (Zheng et al., 2003). Ce phénomène de blocage se traduit par une absence de sortie du tourteau au niveau de la restriction. Il se forme alors un bouchon en tête de vis et le tourteau extrude au niveau des perforations destinées à l'écoulement de l'huile. Pour prévenir les phénomènes de blocage, un préchauffage de la tête de vis avant le pressage est alors préconisé par plusieurs auteurs (Sivakumaran et Goodrum, 1988; Tostenson et al., 2004).

- **Le diamètre de la restriction:**

L'effet du diamètre de la restriction, sur différents équipements de pressage, pour le pressage de graines de jatropha est représenté figure 10.



**Figure 10 :** Effet du diamètre de la restriction sur le rendement en huile et la pression en tête de vis pour le pressage de graines de *Jatropha* (□, données obtenues sur l'expeller Sayari à 56 rpm (Beerens, 2007) et ▲, données obtenues sur presse Komet S87G à 115 rpm (Karaj et Müller, 2011

Le diamètre de la restriction influence principalement sur la pression mesurée en tête de vis. Une diminution du diamètre de la restriction a pour effet une augmentation de la pression à l'extrémité du fourreau ainsi qu'une augmentation de température mesurée en tête de vis (Jacobsen et Backer, 1986; Vadke et Sosulski, 1988). En conséquence, une diminution du diamètre a pour effet une augmentation du rendement en huile (figure 10). Les rendements en huile les plus élevés en pressage à vis peuvent atteindre de 80 à 94%, en fonction des diamètres de restriction utilisés. A l'inverse, plus le diamètre

d'ouverture de la restriction est important, plus le tourteau est friable et peut prendre l'apparence de graines broyées, indiquant un pressage inefficace. L'effet du diamètre de la restriction sur les débits d'huile ou la capacité de la presse est moins prévisible. Certains auteurs ont mis en évidence une diminution de la capacité avec l'augmentation du diamètre de la restriction (Beerens, 2007; Vadke et Sosulski, 1988). Jacobsen et Backer (1986) ont mis en évidence l'apparition d'un optimum de capacité en faisant varier le diamètre de la restriction. La pression générée est un facteur dépendant également de la vitesse de rotation de la vis.

- La vitesse de rotation de la vis:

La vitesse de rotation de la vis influe sur deux variables du procédé: la pression générée le long de la vis de pressage et la température de l'huile (Vadke et Sosulski, 1988).

Une augmentation de la vitesse de rotation de la vis a pour effet une diminution de la pression et une diminution de la température de l'huile. Suivant la matière première d'entrée, une augmentation de la vitesse de rotation de la vis peut influencer de plusieurs manières sur le rendement d'extraction d'huile (tableau07)

Matière première	Variation de la Vitesse de rotation de la Vis	Evolution du rendement	Evolution de la pression	Type de presse	Auteurs
Colza	De 25 à 36 rpm	□ de 78 à 79%	□ de 9 à 5 MPa	Komet D85G	Pietsch ET Eggers (2011)
	de 70 à 120 rpm	□ de 90 à 86%	□ de 9 à 8 MPa	Mini 40 Screw press (Simon-Rosedowns)	Vadke ET Sosulski (1988)
Jatropha	De 115 à 255 rpm	□ de 84 à 70%	□ de 7, 5 à 3, 4 MPa	Komet S87G	Karaj ET Müller (2011)
	De 28 à 70 rpm	□ de 85 à 68%	□ de 12, 7 à 1, 3 MPa	BT Bio Presse Type 50 (BT Biopresser)	Beerens (2007)
Sésame	de 30 à 75 rpm (Optimum à 45 rpm)	De 45 à 80% □ de 80 à 40%	Non mesuré	non précisé	Olayanju ET al. (2006)
Amande	de 50 à 110 rpm	de 80 à 95%	non mesuré	Tite 002 (Tiny Tech Plant. Inde)	Akinoso et al. (2009)

**Tableau 07:** Effet de la vitesse de rotation de la vis sur le rendement, la pression et la température pour différentes matières premières.

L'évolution du rendement en huile en fonction de la vitesse de rotation de la vis dépend de la matière première pressée. Pour les graines de colza et jatropha, le rendement diminue (de 4% à 17%) systématiquement avec l'augmentation de la vitesse de rotation de la vis. Cette diminution de la vitesse de rotation s'accompagne d'une diminution de la pression mesurée en tête de vis. En revanche, pour les graines de sésame, l'augmentation de la vitesse de rotation de la vis fait apparaître un optimum de rendement (80% à 45 rpm). Un comportement très différent est observé pour le pressage des amandes de palme. Le rendement augmente de 15% en augmentant la vitesse de rotation de 50 à 110 rpm.

- Effet de la matière première sur le pressage:

Il n'existe pas à ce jour d'étude comparative réalisée sur plusieurs espèces triturées sur une même presse. Cependant, les caractéristiques morphologiques (taille, masse volumique), texturales et biochimiques de la matière première à presser pourraient avoir une influence sur les performances du pressage (*Rombaut.N et al., 2013*)

- Effet du procédé sur la qualité de l'huile:

Le procédé de trituration a un impact sur la stabilité oxydative de l'huile (Choe et Min, 2006). Un conditionnement thermique préalable des graines de sésame a engendré une augmentation de la stabilité oxydative de l'huile de sésame obtenue par pressage (Yoshida et Takagi, 1997).

Les auteurs attribuent cette tendance à l'augmentation de la teneur en polyphénols dans l'huile. Ces résultats coïncident avec ceux de Veldsink *et al.* (1999). Leurs travaux ont montré qu'un prétraitement thermique des graines de colza par la vapeur, les micro-ondes ou les infrarouges permettait d'augmenter la stabilité oxydative des huiles produites. Les procédés de raffinage des huiles, intervenant après le pressage, ont cependant pour effet de dégrader les polyphénols et tocophérols. Il en résulte que certaines huiles raffinées présentent une stabilité oxydative inférieure à celle des huiles brutes (par exemple l'huile de soja) (Jung *et al.*, 1989; Kwon *et al.*, 1984).

#### **7. Spécificités de l'extraction de l'huile de pépins de raisin:**

L'extraction de l'huile de pépins est réalisée sur des pépins séchés à une teneur en eau inférieure à 10%. Les pépins subissent une première pression sans extraction d'huile par un expandeur. Cette opération a pour but de transformer les pépins en petits pellets<sup>14</sup> de façon à faciliter l'extraction par solvant de l'huile contenue dans les pépins (Morin, 1992). L'huile brute obtenue contenant des cires, son raffinage est indispensable pour la rendre acceptable par le consommateur (Bourzeix et al., 1998; Morin, 1992). Récemment, de nouvelles unités de trituration des pépins se sont implantées, basées sur un pressage à froid (Goyard, 2010).

### 8. Les avantages de l'huile de pépins de raisin pour l'alimentation:

Elle est très appréciée par de nombreux chefs pour conserver la saveur originelle des aliments et pour sa polyvalence. L'huile de pépins de raisin est capable de monter à des températures élevées sans fumer. Comme elle possède un point de fumée plus élevée que les autres huiles telles que d'olive, de maïs, ou de sesame, elle peut être utilisée en toute sécurité pour la friture et la cuisson.

Elle est un excellent ingrédient dans les vinaigrettes, marinades et mayonnaise maison.

L'huile de pépin de raisin biologique pressée à froid conserve la plupart des ingrédients naturels bénéfiques par rapport aux huiles pressées chimiquement.

*Revue scientifique: Nature; article: Bien choisir son extrait de pépins de raisin riche en OPC.*

### 9. Les méthodes d'extraction de la matière grasse:

L'extraction des corps gras a le plus souvent un double objectif:

- Le dosage de la matière grasse;
- L'analyse de la matière grasse extraite.

Elle doit donc être totale et ne pas modifier la nature de la matière grasse. Il existe de nombreuses méthodes de dosage de la matière grasse:

#### 1. Méthodes gravimétriques:

- Extraction par un solvant sans traitement préalable.
- Extraction par un solvant après traitement chimique préalable (acide ou alcalin).

#### **a) Extraction de l'huile par un solvant sans traitement préalable:**

Quelquefois, il est nécessaire d'éliminer dans un premier temps la phase aqueuse, soit par dessiccation à l'étuve, soit par séchage sur sulfate de sodium anhydre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

La fraction des lipides peu liée à la matière à analyser appelée « les lipides libres » ou « matières grasses libres » s'extrait à la température du laboratoire à l'aide des solvants (Adrian et al., 1998).

Les solvants les plus souvent utilisés sont l'oxyde diéthylique, l'hexane, les mélanges chloroforme-méthanol (2-1 v/v) (réactif de Folch), chloroforme-isopropanol (3-2 v/v), dichlorométhane-méthanol (2-1 v/v). Il est important de préciser la méthode utilisée car les différents solvants n'ont pas le même pouvoir extracteur (en particulier envers les phospholipides). Dans le cas de l'analyse quantitative, l'extrait est ensuite purifié sur une colonne constituée d'un mélange sulfate de sodium anhydre (Ollé, 2002).

Quel que soit le protocole retenu, il est indispensable de préciser les conditions opératoires (nature du solvant, température d'extraction, etc) pour pouvoir interpréter les résultats (Lecoq, 1965).

**b) Extraction après traitement chimique:**

Le traitement chimique est le plus souvent une hydrolyse destinée à détruire les lipoprotéines, modifier les structures des peptides et glucides pour extraire les lipides totaux (lipides libres+ lipides liés). Ce sont les méthodes de Folch et al. (1957) et de Bligh et Dyer (1959) qui sont les plus utilisées. Un solvant ternaire chloroforme/méthanol/eau est mélangé à l'échantillon pour déplacer les lipides et les dissoudre dans la phase chloroformique tandis que la phase supérieure constituée d'un mélange de méthanol aqueux contient les substances non lipidiques (Adrian et al., 1998).

Dans tous les cas, les méthodes avec traitement chimique ne permettent pas une étude correcte de la composition et de la qualité de la matière grasse obtenue.

2. Dosage direct par spectrométrie: (methodes physiques)

- RMN (Résonance Magnétique Nucléaire)
- IR (Infrarouge).

**a) Résonance magnétique nucléaire RMN basse résolution**

C'est une méthode basée sur la mesure par spectrométrie de résonance magnétique nucléaire à basse résolution et à onde pulsée de la teneur en composés liquides contenant de l'hydrogène. Elle est rapide et non destructrice et a été utilisée avec succès pour déterminer la teneur en huile des graines oléagineuses. La RMN nécessite de connaître la nature de la matière grasse car l'appareil doit être étalonné avec un corps gras identique à celui que l'on veut doser ; la teneur est calculée à partir d'une courbe d'étalonnage.

Elle ne peut s'appliquer à des composés contenant des corps gras inconnus présents dans les graines oléagineuses, préalablement séchées à  $(103 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$  (Bauman et al., 1963 ; Adrian et al., 1998 ; Ollé, 2002).

**b) Infrarouge:**

Cette méthode est basée sur le principe que les différents constituants des graines présentent des spectres d'absorption caractéristiques dans l'infrarouge, mais se chevauchant. Les auteurs ont démontré que, si l'on réalise les mesures à six longueurs d'onde différentes par un système à trois équations, il est possible de déterminer à la fois l'humidité, les protéines et les matières grasses. Comme pour la RMN, il est nécessaire d'étalonner l'appareil afin de déterminer les constantes spécifiques de chaque constituant pour chaque type de produit à analyser (Ollé, 2002).

### 1. Introduction:

Nos aliments sont rarement stériles. Ils contiennent habituellement des micro-organismes qui pour la plupart sont inoffensifs, certains d'entre eux sont mêmes essentiels au développement de la saveur. C'est le cas pour de nombreux produits de charcuterie / salaison (saucisson, saucisses...), laitiers (fromages, yaourt) ou végétaux (pain, choucroute, bière, vins) pour lesquels la flore microbienne est dite positive. En revanche, d'autres micro-organismes peuvent avoir un effet négatif sur un aliment. On distingue les micro-organismes d'altération qui peuvent être à l'origine de dégradations organoleptiques ou nutritionnelles (fermentations ou développement d'arômes indésirables) et entraînent une diminution de la durée de vie des aliments, des microorganismes pathogènes qui prolifèrent ou libèrent des toxines en causant ainsi des infections ou des intoxications après ingestion par le consommateur. En 2001, en France, 6 800 cas de toxi-infections alimentaires collectives ont été dénombrés (Haeghebaert et al., 2002). Véritable problème de santé publique, ces infections sont également responsables de lourdes pertes économiques (retrait ou destruction de produits). Pour les professionnels, il est donc essentiel de connaître les sources de contamination possibles et les germes dont le développement est potentiellement adapté au produit et à son procédé.

Traditionnellement, les antioxydants synthétiques tels que l'hydroxyanisole butylé (BHA) et hydroxytolone butylée (BHT), ont été largement utilisés dans les aliments en raison de la possibilité d'être cancérigène ou toxiques (Moure et al., 2001) (Jonathan Delgado Adamez et al., 2011).

IL y a une grande préoccupation sur les pathogènes et la détérioration des micro-organismes dans des produits alimentaires en raison de leurs effets défavorables sur la qualité, la sécurité et la durée de conservation des aliments.

En outre, les micro-organismes sont responsables de l'augmentation des épidémies de maladie (Tauxe, 1997). En dehors de cela, il est très important d'utiliser des composés antibactériens naturels. Dans ce contexte, les extraits de plantes ont acquis une attention considérable en tant qu'antimicrobien et des composés antioxydants et ont formés la base de nombreuses applications, y compris dans la conservation des aliments crus et transformés (Jayaprakasha et al., 2000). D'ailleurs, ils ont une saveur caractéristique et une activité antibactérienne et antioxydante (Smid et Gorris, 1999). Aujourd'hui, nous savons que certains extraits des plantes ont une large activité contre les bactéries Gram-positif et Gram-négatif de la pathogénèse alimentaire et ils ont également une activité antifongique (Baydar et al., 2004)

Le raisin (*Vitis vinifera* L) est l'une des cultures fruitières les plus répandues, cultivés dans le monde entier, et leurs graines sont considérées comme une source pertinente des composés polyphénoliques. Ces derniers ont été prouvés divers effets biologiques tels qu'un antioxydant ou un antimicrobien.

L'extrait des graines de raisin a également été signalé pour son potentiel d'être un aliment conservateur en raison de son activité antimicrobienne (Rhodeet al., 2006). Différents auteurs ont signalés que les extraits aqueux ont une activité sur *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter coli* (Katalinic et al., 2010)

L'objectif de ce travail est d'étudier l'activité antimicrobienne de l'extrait de pépins de raisin (l'huile de pépins de raisin).

### **2. La source de contamination par des pathogènes et développement des micro-organismes dans les aliments:**

Les germes pathogènes ubiquitaires, c'est-à-dire présents et véhiculés par l'eau ou le sol, sont à l'origine de contamination primaire des matières premières alimentaires. *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* ou *Listeria* sont les germes pathogènes les plus fréquemment isolés d'échantillons d'eau ou de sol. Par la suite, lorsque les matières premières sont transformées, elles sont susceptibles d'être contaminées par d'autres micro-organismes présents, même à faible concentration, dans l'usine. Cette niche écologique évolue en fonction de l'environnement de l'usine (air, surface, matériels, personnels...) et des processus technologiques conduisant au produit fini (Bourgeois et al., 1996). Dans l'usine, les risques de contamination peuvent être réduits en optimisant sa conception et en appliquant des règles d'hygiène appropriées (nettoyage, désinfection...). Les processus technologiques sont à l'origine de la sélection de la flore psychrotrophe (*Listeria*, *Escherichia*, *Yersinia*, *Aeromonas*) pour les aliments réfrigérés, ou de germes sporulés (*Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*) pour les aliments ayant subi un traitement par la chaleur. Les micro-organismes sont également sensibles à nombre de modifications physico-chimiques appliquées à la matière première. Outre la température, le pH, l'activité de l'eau (*aw*) ou le potentiel d'oxydo-réduction peuvent évoluer et favoriser la colonisation préférentielle par un micro-organisme pathogène particulièrement adapté à ce nouvel environnement.

Dans le cas particulier des abattoirs, la contamination des carcasses est souvent causée par des germes présents sur la peau, les plumes (*Staphylococcus*, *Listeria*) ou dans le tube digestif et les muqueuses (*Campylobacter*, *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*) des animaux (James et al., 1999).

### **3. Les principaux germes impliqués dans les toxi-infections ou les intoxications alimentaires et les aliments associés:**

Les toxi-infections alimentaires sont des maladies contractées en consommant des aliments dans lesquels les germes pathogènes présents se sont par la suite multipliés dans le contenu intestinal. Les

intoxications sont provoquées par l'ingestion d'aliments contenant une ou des toxines, produites par des micro-organismes pathogènes. Parmi les microorganismes pathogènes, on compte des bactéries, des champignons, des parasites et des virus.

**Tableau08:** Bactéries identifiées et aliments associés (Bourgeois et.al., 1996; Haeghebaert et al., 2002).

Bactéries impliquées majoritairement dans les toxi-infections ou les intoxications alimentaires	Principaux aliments associés
<i>Salmonella spp.</i>	Œufs, produits à base d'œufs, viande crue
<i>Staphylococcus aureus</i>	Lait, produits laitiers, viande, œufs, produits à base d'œufs, charcuterie, volaille, poisson, fruits de mer
<i>Clostridium perfringens</i>	Viande, volaille, poisson, fruits de mer
<i>Bacillus cereus</i>	Lait cru, viande, végétaux
<i>Clostridium botulinum</i>	Aliments en conserve, jambon cru, miel
<i>Escherichia coli</i>	Viandes, lait cru, steaks hachés
<i>Campylobacter jejuni</i>	Lait cru, viande, volailles
<i>Listeria monocytogenes</i>	Lait cru, fromages à pâte molle, glace, poissons fumés, légumes crus, charcuterie
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Lait cru, glace, végétaux, porc cru
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Fruits de mer, viande rouge, volaille, lait cru
<i>Shigella</i>	Légumes crus, fruits crus, lait, (steaks hachés ?)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Fruits de mer, poissons, viande

#### 4. Les souches microbiennes:

##### ☐ Les Salmonelles:

Les salmonelles provoquent une toxi-infection typique, car elle nécessite l'ingestion d'un grand nombre de bactéries vivantes, multipliées dans l'aliment avec leur(s) toxine(s).

Les salmonelles causent les toxi-infections alimentaire collective (TIAC) les plus fréquentes: la moitié des foyers, un tiers des cas de TIAC sont dues aux salmonelles = 4 000 déclarées /an (mais 900 confirmées. le chiffre réel est probablement 10 à 100 fois plus grand). En France en 2001 (64 % des TIAC) (Haeghebaert et al, 2002).

##### A. Maladie : incubation, symptômes, pronostic :

**Incubation :** 12h-24 h après ingestion, parfois 48h. Cette durée assez longue correspond à la multiplication des germes et l'invasion. Elle rend difficile l'identification de l'aliment responsable. En cas de TIAC, on fait la courbe de l'épidémie

**Symptôme:** Diarrhée fébrile liquide fétide (non sanglante en général) avec douleurs abdominales, nausées, céphalée, vomissements parfois. Ce qui est typique, c'est la fièvre (due à l'endotoxine ou LPS), et la durée.

**Bon Pronostic:** guérison spontanée en 3 à 5 jours (parfois 8). Les antibiotiques sont inutiles en général et même néfastes, car perturbent la flore intestinale et affaiblissent l'effet de barrière, augmentant la durée du portage sain.

- Le portage sain, asymptomatique, consiste en l'excrétion fécale de salmonelles, discontinue, pendant 1 à 6 mois.
- Antibio-résistances fréquentes et transférables (plasmides) des salmonelles: ex. de l'importante épidémie multi-annuelle en Angleterre, avec *S. typhimurium* DT104 multirésistante, d'origine bovine.
- Complications: chez les gens vulnérables (vieillards, nouveau-nés, immunodéprimés), la bactérie peut provoquer une déshydratation sévère ou passer dans le sang donnant septicémies, endocardite, méningite. (antibiotique de choix dans ces cas graves : fluoroquinolones).
- Mortalité: 1 à 5 morts pour 1000 cas, probablement 100-500 morts/an en France (chiffres précis non connus, cas déclarés= seulement 10 décès par an !).

### **B. Bactérie, culture, dose infectieuse, toxine :**

La salmonelle est une entérobactérie (donc Gram moins, non sporulée, anaérobie facultative). Il y a de nombreux sérotypes (>2000), souvent typiques d'un écosystème, et qui permettent de repérer les épidémies. Deux sérotypes majeurs: *S. enteritidis* (aviaire), et *S. typhimurium* (viande volaille, bovin, porc), dont le DT104 multi-résistant.

Les salmonelles sont (heureusement) souvent en petit nombre au départ dans les aliments:

- pour détecter il faut pré-enrichir 18h, enrichir 1-2 jours, isoler sur milieu sélectif 1-2j, identifier (lactose négative, H<sub>2</sub>S+): Donc au moins 3 jours. Méthode immunoenzymatique E.I.A.Foss, 18h après enrichissement.
- Réglementairement il faut zéro salmonelle dans 25 g d'aliment
- Généralement il faut une **forte dose infectieuse: 106 bactéries vivantes**. La pathogénie vient de l'invasion et de la libération d'**endotoxine= lipo-polysaccharide de la paroi (LPS)**, toxique si grand nombre de bactéries vivantes. Présence aussi de cytotoxine (s).

### **C. Aliments en cause, épidémiologie :**

Le plus souvent la TIAC à salmonelle vient des oeufs et produits à base d'oeuf cru (mayonnaise, mousse au chocolat), contaminés par *Salmonella enteritidis*.

Aussi, mais moins souvent, steak haché, viande de volailles, fromages crus, poissons, fruits de mer.

### □ Staphylococcus:

L'entérototoxicose staphylococcique est une intoxication (la toxine agit même si les bactéries sont tuées) très fréquente (2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> TIAC, 500 cas déclarés par an) due à *Staphylococcus aureus*, aussi agent d'infections et de septicémies.

#### A. Maladie : incubation, symptômes, pronostic :

Incubation: très brève, 2 h après ingestion, (30min à 6h). Vomissements brutaux et souvent après une grosse céphalée, parfois suivis d'une diarrhée indolore, avec souvent un syndrome de "choc" par déshydratation. Cette intoxication guérit vite en 12-24 h (mais laisse fatigué). Dans de très rares cas, il y a un collapsus fatal par déshydratation (bébé, vieillard).

#### B. Bactérie, culture, dose infectieuse, toxine :

Cette bactérie, Gram +, est une anaérobie facultative responsable d'intoxication par ingestion d'une entérotoxine (Sandel et McKillip, 2004).

Cette toxine est détruite par la chaleur (supérieure à 60°C) ou le froid (inférieure à 7°C), sa dose infectieuse est très faible, de l'ordre de 1 ng (Larpen, 2000b) (Intoxication puissante: 100 ng de toxine fait vomir, même si staphs sont tués). En 2001, *Staphylococcus aureus* a été à l'origine, en France, de 15,8 % des TIAC (Haeghebaert et al., 2002).

*Staphylococcus aureus* (staphulè = grappe de raisin, aureus= doré, car colonies jaunes d'or). Coque gram +. Catalase + (Streptoc. Cat-). Repéré par lécithinase sur milieu de Baird-Parker au jaune d'œuf, puis coagulase+ sur sang. Une souche sur 3 est toxigène.

Staph tolère 20% NaCl, survit bien au sec (aW 0.83 des salaisons médiocres) et au froid (glaces décongelées), mais elle est thermosensible. Staph. est bien visible au microscope optique dans les aliments. Produit des entérotoxines protéiques de petit PM. Toxine A, 26 kDa compacte: toxine très thermostable, résiste 30' 100°C.

#### C. Aliments en cause, épidémiologie :

On trouve Staph. dans les plats préparés, manipulés, contaminés par le CUISINIER (crème, glace, pâtisserie, pâté, salade composée...). Staph pousse 7-50 fois vite à 25-30°C. Synthèse toxine à t>18°C (parfois 10°C). La dose infectieuse est de 105/g aliment, atteinte en 3h seulement. La toxine est thermostable, la re-cuisson ne protège pas. Staph. vient de la peau infectée du cuisinier (panaris, furoncles), des narines, des cheveux

Fromages et produits laitiers : dans ¼ des cas, Staph. vient d'une mammite qui contamine le lait

#### D. Prophylaxie :

- Hygiène en cuisine (mains propres, lavées souvent et bien, gants stériles changés souvent ;
- Cuire les aliments préparés, réfrigérer rapidement les aliments prêts (de 63° à 10° en - de 2h), ne pas recongeler (glaces), ne pas servir à l'avance (buffet) ;

- Lutte contre les staphylocoques coagulase + (= S.aureus et voisins) en élevage et production laitière et fromagère (par l'hygiène).

### □ *Escherichia coli: (ETEC)*

C'est une bactérie Gram -, anaérobie facultative. Les pathologies les plus graves sont rencontrées avec les *Escherichia coli* entérohémorragiques dont le chef de file est *Escherichia coli* O157:H7 (Centre d'information des viandes, 2002). Elles produisent de puissantes toxines appelées "vérotoxines" responsables des pathologies. En France, l'origine alimentaire de ces maladies n'est pas vérifiée. *Escherichia coli* O157:H7 a été cependant mise en cause dans des épidémies d'origine alimentaire aux États-Unis, au Canada ainsi qu'en Écosse et au Japon (ICMSF, 1996).

(ETEC = Entéro-Toxinogène *E. coli*) est un germe très banal, normalement non pathogène, présent en grand nombre dans l'intestin de tous les animaux, et donc un bon indicateur de contamination fécale. Certaines souches sont pathogènes pour l'homme ou pour les animaux (K88 porc, K99 veau, et pathogènes /lapin étudiées par lab

➤ Quatre types sont pathogènes pour l'homme :

- EPEC Entéro-Pathogènes (épidémie nouveaux-nés /hôpital, enfants pays pauvres, attachement-effacement, pas de toxine),
- EIEC Entero-Invasif (genre de shigellose diarrhée hémorragique fébrile = dysenterie, multiplication intracellulaire),
- ETEC Entero-Toxinogène = TIAC (deux entérotoxines + adhésine),
- EHEC Entéro-Hémorragiques = TIAC (EHEC=VTEC=STEC, vient du steak)

**A. Maladie:** Turista = diarrhée du voyageur (en pays chaud/pauvre). Après 10-15 h d'incubation, diarrhées principalement, accompagnées éventuellement de douleurs, nausées, céphalée, vomissements, qui conduisent à déshydratation (minicholéra). Guérit en 3-4 j sans traitement, réhydratation orale suffit (boissons, Cola).

**B. Bactérie:** *E.coli* entérobactérie classique psychrotrophe. Dose infectieuse élevée: 10<sup>6</sup> bactéries. *E.coli* ETEC produit deux entérotoxines et des adhésines (adhésion à l'entérocyte):

- Toxine LT - Thermo-Labile, PM 86 kda-> sous-U 20k, plasmide comme choléra et/ou
- Toxine ST - Thermo-Stable, petit PM 2 kda

**C. Aliment:** Infection par l'eau contaminée par des selles (péril fécal -> turista), légumes mal lavés, glaces, fromages. Non reconnu comme TIAC en France, mais fréquent au tiers-monde.

Prophylaxie individuelle: ne boire que l'eau traitée (hydroclonazone), bouillie (thé) ou boisson en bouteille scellée (Cola). Ne manger aucun légume cru, éplucher tous les fruits, refuser les glaces artisanales.

Prophylaxie collective: casser le cycle oro-fécal: WC corrects, traiter les eaux usées, traiter l'eau potable

**EHEC:** Entéro-Hémorragique E. Coli Note : O antigène somatique : H antigène flagellaire

EHEC sérotype majeur O157:H7 Toxine (VTEC, Verotoxin = STEC, Shiga-toxin) +Attachement. Grande actualité, maladie émergente très grave, a donné récemment de grandes épidémies USA: 70 000 cas & 70 morts par an;

Bactérie Les sérotypes EHEC, comme O157:H7 (et autres sérotypes: O26, 103, 111) font une vérotoxine, les EHEC produisent une intimine (gène eae ou AEEC) = un facteur d'attachement-effacement. La dose infectieuse est faible (environ 10-100 bact. vivantes). Ces coli sont acido-tolérants (viande, salade, jus).

**D. Prophylaxie:** hygiène, ouvriers formés autocontrôles, cuisson correcte (65-70°C à cœur), hygiène générale de la cuisine (contaminations croisées).

### 5. Les différentes méthodes d'évaluation du pouvoir antimicrobien des extraits des plantes :

#### Techniques sur milieu solide :

##### ▪ **Méthode vincent:**

Rapportée par Beyler Maurel (1979), cette méthode donne d'excellents résultats pour la pratique courante. Elle consiste à déposer à la surface du milieu gélosé préalablementensemencé, des disques de papier filtre (6 mm de diamètre) imbibés de 0.01 ml de l'huiles essentielles à tester (Belaiche.1979).

##### ▪ **Méthode de microathmosphère :**

Une boîte de Pétri estensemencée avec les germes testés alors qu'on dépose quelques gouttes d'huiles essentielles sur un disque de papier filtre de 4 cm de diamètre au fond et au centre du couvercle. La boîte est incubée couvercle en bas. Il se produit une évaporation des substances volatiles et on lit.

Après incubation à 37° pendant 24h, on effectue la lecture de la croissance des germes ou l'inhibition de leur croissance. (Rapportée par Beylier Maurel (1974))

Cette technique a été modifiée par Bendjilali et coll. (1984), de telle sorte qu'une seule boîte de Pétri puisse être le siège de l'étude du pouvoir antibactérien d'une seule huile essentielle sur plusieurs souchesensemencées en stries radiales de 30 mm de longueur chacune à la surface du milieu. En plus de l'intérêt économique de cette technique l'inoculation radiale permet d'estimer aisément

l'inhibition en mesurant l'extension de la poussée et aussi de comparer la sensibilité de plusieurs souches dans les mêmes conditions.

### ❑ Technique sur milieu liquide

#### ▪ **Technique de Maruzella :**

Rapportée par Beylermaurel (1976), le principe consiste à faire agir en phase liquide des concentrations croissantes d'huiles essentielles après adjonction d'un émulsionnant (Belaïche, 1979).

#### ▪ **Méthode de culture sur membre millipore :**

La technique utilisée est la même que celle décrite dans la méthode de contact directe en milieu gélosé. Sa variante consiste à déposer des membranes millipores à la surface des boîtes de Pétri contenant les différentes concentrations d'huile essentielle. L'ensemencement se fait par stries sur les membranes à l'aide d'une anse de platine calibrée.

#### ▪ **Méthode de diffusion des disques (contact indirect) :**

Cette méthode suit le même principe de l'antibiogramme décrit par Kirby-Bauer (1960) et standardisée par le comité national des normes pour laboratoires cliniques (Prescott et al., 2003; NCCLS, 2003). Elle peut prévoir avec certitude l'efficacité in vivo du produit en question. Elle est basée sur la diffusion des substances à tester imprégnées sur des disques en papier qui doivent être déposés à la surface d'un milieu solide ensemencé. Il se forme alors un gradient de concentrations autour du disque de papier et la croissance bactérienne est bloquée jusqu'au diamètre où les concentrations du gradient sont égales ou supérieures à la CMI (Rey, 2010). Tandis que le mécanisme de diffusion se produit, la multiplication des germes ensemencés à la surface de la gélose intervient. Au moment où se manifeste la phase logarithmique de croissance, les bactéries se multiplient rapidement que la diffusion du produit ne peut progresser et les cellules bactériennes non inhibées continuent à se multiplier jusqu'à ce que la culture puisse être visualisée.

### **6. L'aromatogramme :** (la technique utilisée dans notre étude)

(étymol. du grec arôma et du latin aroma signifiant "arôme", et du grec gramma signifiant "lettre, écriture") est une méthode de mesure in vitro du **pouvoir anti-bactérien**, anti-viral anti germeicide anti parasitaire etc... des huiles essentielles<sup>1</sup>. Cet examen est différent d'un antibiogramme car ici il peut être mesuré l'activité des huiles essentielles (molécules aromatiques) sur tous les organismes pathogènes (virus bactéries germes parasites...) alors que l'antibiogramme mesure l'activité des molécules de synthèse sur des bactéries.

Plus une huile essentielle est active contre différents organismes pathogènes plus son indice aromatique est dit élevé. Certaines huiles essentielles tuent l'organisme pathogène par contact tandis

## **Chapitre II      Evaluation du pouvoir antibactérien de l'huile de pépins de raisin**

---

que d'autres appelées huiles essentielles de terrain empêcheront les micro-organismes pathogènes de se multiplier en rééquilibrant le terrain.

### Les principales techniques :

1. Sur gélose (milieu solide) : On mesure en millimètres le halo d'inhibition produit par disques de papier filtre imprégné d'huile essentielle
2. En micro-atmosphère : Le disque imprégné d'huile essentielle est disposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, et non plus en contact avec la gélose. La boîte de Pétri est fermée, couvercle en bas et placée dans une étuve à 37 °C. On mesure le halo d'inhibition des colonies microbiennes situées sur l'aire d'évaporation de l'huile essentielle
3. Sur bouillon (milieu liquide) : Il faut solubiliser chaque huile essentielle étudiée en utilisant un agent émulsionnant qui ne doit pas interférer dans les résultats (le tween, par exemple)

### Fiabilité de l'aromatogramme :

La fiabilité consiste à pratiquer plusieurs aromatogrammes en même temps sur le même germe et d'obtenir des résultats identiques. La même technique de laboratoire doit toujours être utilisée. De même que pour l'antibiogramme, il existe une réserve de principe à la transposition in vivo de résultats obtenus in vitro.

L'aromatogramme est une technique séduisante, qui permet au vétérinaire de délivrer une prescription ciblée sur le germe en cause. L'aromathérapie est donc une alternative aux antibiotiques d'autant plus que les huiles essentielles ont aussi prouvés leurs puissances d'action face aux virus.

### 1. Histoire :

L'origine des produits fermentés remonte à des temps immémoriaux ; probablement à l'époque où l'homme a commencé à domestiquer les espèces laitières et à utiliser leurs laits.

Les bactéries lactiques du sol ou des plantes avaient dû contaminer le lait et s'y étaient développées. De même, elle avait dû se répandre et s'installer dans les récipients servant à recueillir et conserver le lait qu'ils soient en bois, pierre ou peau. Cette contamination accidentelle ne permettait sûrement pas d'avoir des produits ayant des saveurs définies et stables mais elle avait indéniablement l'avantage (par le développement de l'acidité) de prévenir le développement de la flore pathogène. (Luquet 1990).

### 2. Définition :

Selon le Codex Alimentarius, la dénomination yaourt ou yoghurt est donnée selon la norme A-11 de 1975 comme suit: Le yaourt est un produit laitier coagulé obtenu par fermentation lactique grâce à l'action de *Lactobacillus bulgaricus* et de *Streptococcus thermophilus* à partir du lait frais et du lait pasteurisé (concentré, partiellement écrémé, enrichi en extrait sec) avec ou sans addition de lait en poudre, poudre de lait écrémé, lactosériques,... etc. Dans le produit fini, les microorganismes doivent être viables et abondants (Vignola., 2010)

La législation de nombreux pays exige que les bactéries du yaourt soient vivantes dans le produit mis en vente. D'autres pays admettent qu'à la suite d'un traitement thermique destiné à améliorer la durée de conservation, le produit ne contienne plus de bactéries vivantes. (Anonyme ; 1995).

### 3. Composition du yaourt :

#### ➤ Microbiologique :

Le yaourt est un écosystème simple dont la production repose sur les interactions entre *S.thermophilus* et *L.bulgaricus* .l'importance technologique de l'évolution de cet écosystème a suscité bien des intérêts. Lors de la fermentation du yaourt, le métabolisme de *S.thermophilus* *L.bulgaricus* est le principal responsable de la qualité organoleptique du produit fini (Bourlioux et al ; 2011).

#### ➤ Biochimique :

La composition physicochimique d'un pot de yaourt est présentée dans le tableau (Laurence et al. 2004).

Composition	Teneur
<b>Protéines</b>	4%
<b>Lipides</b>	0-4 g
<b>Cholestérol</b>	15 mg
<b>Glucides</b>	5-18%
<b>Lactose</b>	3%
<b>Teneur en matière sèche laitière</b>	10-16%
<b>Calcium</b>	155-200 mg (17 à 24%)
<b>Vitamines</b>	A, D, B (B2, B12)
<b>Calorie pour 100 g</b>	90 Kcals

**Tableau09** : Composition physicochimique du yaourt (Laurence et al. 2004).

#### 4. Intérêt nutritionnel :

Selon Jeant et al. (2008), un pot de yaourt nature possède la même valeur nutritive qu'un verre de lait.

Tout en procurant un réel plaisir gustatif, le yaourt est l'un des produits laitiers les plus digestes et ses bienfaits nutritionnels sont nombreux:

- Il contribue à l'équilibre de la flore intestinale et régularise le transit;
- Il entretient les muscles et les organes vitaux grâce à sa teneur intéressante en protéines;
- Il favorise le bon développement de l'enfant et de l'adolescent, et aide les adultes à conserver une bonne densité osseuse par le calcium et les protéines qu'il apporte à l'organisme;
- Certaines vitamines sont utilisées par les bactéries lactiques (vitamine B12) d'autre en sont produites (acide folique) (Martin, 2004).

#### 5. Caractéristiques générales des bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont les micro-organismes les plus utilisés pour la fabrication des laits fermentés. Dans le cas des yaourts, les bactéries utilisées sont les espèces : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.

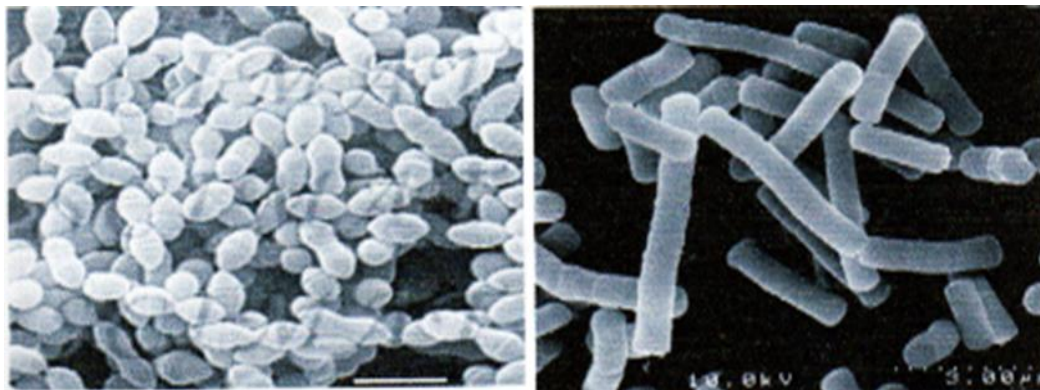
##### Description de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*

*Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus* est une cocci Gram positif, anaérobie facultative et immobile (Roussel et al., 1994). C'est une bactérie dépourvu d'antigène de type D et sensible au bleu de méthylène (0,1%) et aux antibiotiques. Elle est résistante au chauffage à 60°C pendant

30minutes (Dellaglio et al.,1994) et sa température optimale de croissance varie entre 40et 50°C (Lamoureux,2000).

Alors que, *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* est une bactérie thermophile, Gram positive et catalase négative, en forme de bâtonnets plus ou moins longue, et immobile.

Elle est très exigeante en calcium et en magnésium, et sa température optimale de croissance et d'environ 42°C (Marty-Teyssset et al ., 2000).



*Streptococcus thermophilus*

*Lactobacillus*

**Figure11** : les bactéries lactiques du yaourt (Bourlioux et al ; 2011)

<i>Streptococcus salivarius subsp thermophilus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus</i>
<p>Croissance optimale (37- 42°C)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ne se développe pas au-dessus de 20 °C</li> <li>- SE développe encore à 50 °C</li> <li>- supporte un chauffage de (30 min à 65 °C)</li> <li>- Homofermentaire, produit très peu de composés contribuant à l'arôme du yaourt (diacetyl, acétoine, acétaldéhyde)</li> <li>- Production d'acide lactique L (+) jusqu'à une concentration de (0.7- 0.8 %)</li> <li>- Supporte un milieu acide PH = (4 - 4.5)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Croissance optimale (42 ~ 47 °C)</li> <li>- limites de développement (15 - 52 °C)</li> <li>-Homofermentaire, mais produit un peu D'acétaldéhyde responsable de l'arôme du yaourt.</li> <li>-Production d'acide lactique D (-), jusqu'à une concentration de 1,7 %.</li> <li>-Supporte sans difficulté un milieu acide PH (4 - 4.5).</li> </ul>

**Tableau10** : principaux caractères de *Streptococcus thcrmophilus* et *lactobacillus bulgaricus* (CORVI, 1997)

### 6. Comportement associatif des bactéries du yaourt :

La stimulation de *Streptococcus thermophilus* par *Lactobacillus bulgaricus* est réalisée grâce à l'activité protéolytique de ce dernier, qui libère des peptides et des acides aminés au profit du streptocoque. En retour, *S. thermophilus* fournit de l'acide formique et du CO<sub>2</sub> qui vont stimuler la croissance de *Lactobacillus bulgaricus* (Béal et Sodini, 2012).

### 7. Rôle des bactéries du yaourt :

*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* sont des bactéries homofermentaires à plusieurs rôles:

- **Production de l'acide lactique:** C'est la fonction principale des bactéries lactiques. L'acide lactique est un acide organique qui permet de conserver et de concentrer la matière sèche du lait, il déstabilise les micelles de caséines, ce qui mène à la formation du gel (Lamontagne et al., 2002 ; Beal et Sodini, 2012).
- **Activité protéolytique:** Les bactéries lactiques possèdent des endopeptidases associées aux enveloppes cellulaires et des exopeptidases liées aux parois, et un équipement intracellulaire comportant lui aussi des amino-peptidases servant à l'hydrolyse des polypeptides ou des protéines. Cette activité entraîne une augmentation de la teneur en acides aminés libres (Lamontagne et al., 2002).
- **Activité lipolytique et estérasique:** Les activités lipasiques des bactéries lactiques seraient impliquées dans la production des acides gras de longues chaînes à partir des mono- et diglycérides alors que les activités estérasiques libèrent les acides gras libres (Kamaly et Marth, 1989; Stead, 1986).
- **Production des composants aromatiques:** Ces bactéries produisent des composés secondaires tels que le diacétyl, l'acétaldéhyde, la cétone et la cétoïne; ces composés participent au développement de la saveur et de l'arôme du yaourt (Lamontagne et al., 2002; Sodini et Beal, 2012).
- **Production d'agents texturants:** Certaines bactéries lactiques produisent des polysaccharides qui jouent le rôle d'agents de texture et donnent au produit fini des caractères rhéologiques particuliers modifiant la viscosité. Il est couramment admis que dans les laits fermentés, cette fonction est exercée par *Streptococcus thermophilus* (Lamontagne et al, 2002 ; Sodini et Beal, 2012).

8. Technologie du yaourt :

La fabrication du yaourt est un procédé qui nécessite la maîtrise de chaque étape pour avoir un produit fini conforme qui répond à l'attente du consommateur. Pour cela, toutes les connaissances et les progrès réalisés dans le domaine doivent être exploités. Le procédé de fabrication du yaourt diffère d'un yaourt à un autre (yaourt brassé, yaourt ferme, yaourt fruité, etc.), les principales étapes sont illustrées dans le diagramme de la figure 12

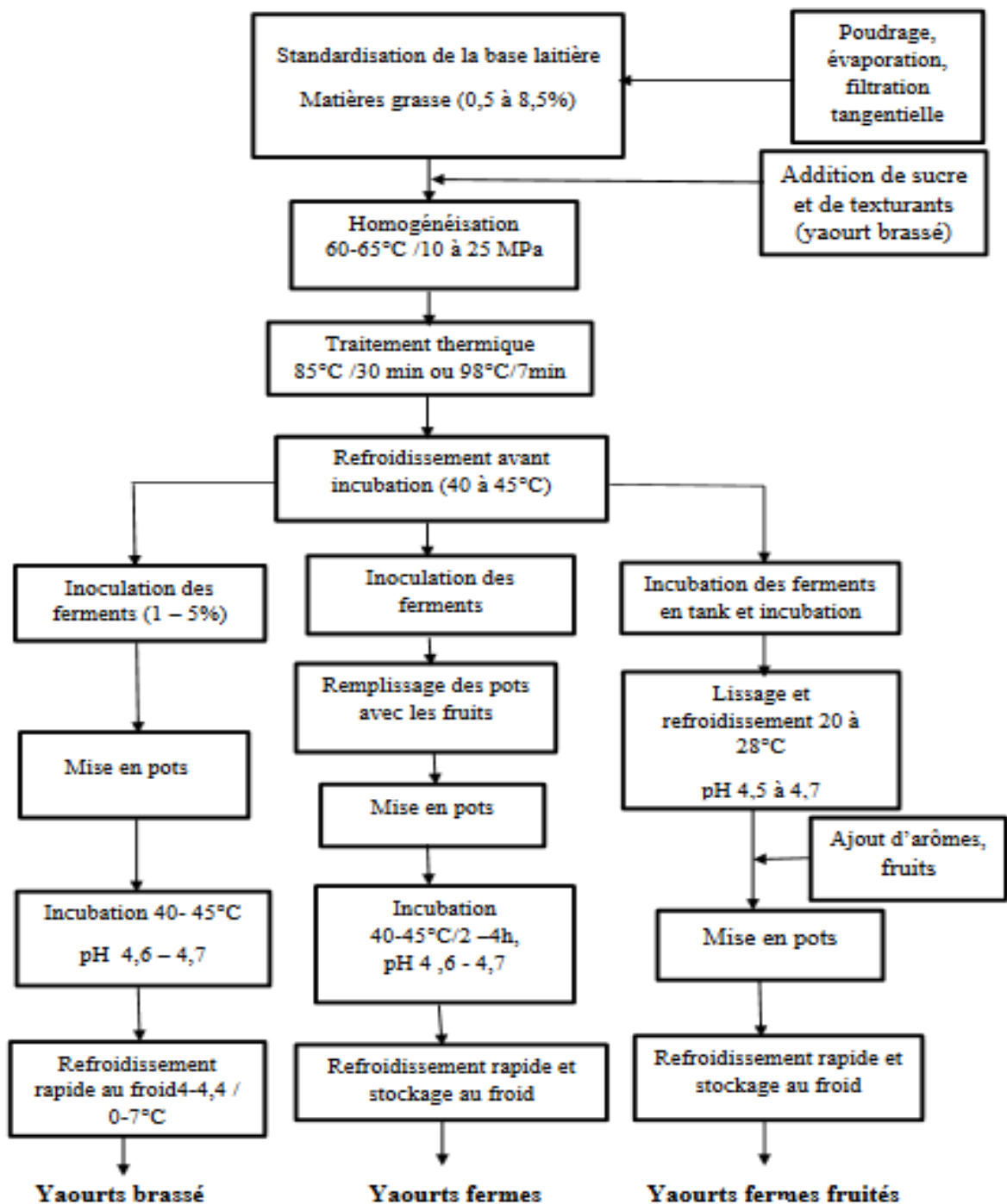


Figure 12: Diagramme présentant la technologie du yaourt (Jeantet.,2008)

Différents types du yaourt: Il existe deux types de yaourts

- Selon la technologie de fabrication:
  - Yaourt ferme ou traditionnel, dont la fermentation se fait après conditionnement pots ; ce sont généralement les yaourts naturels, aromatisés. (Pacikora ; 2004).
  - Yaourt brassé, dont la fermentation se fait en cuve avant brassage et conditionnement, c'est le cas des yaourts peut être réalisée soit à partir de lait entier, soit à partir de lait partiellement ou totalement écrémé (3.5%; 1.00%; 00%de MG) .ici l'ajout des fruits ou d'arômes est réalisé après refroidissement du lait fermenté (Assche ; 1996).
- Selon la teneur en matière grasse:
  - Yaourt entier: au minimum il contient 3% en poids de MG ; en pratique industrielle, il renferme 3 à 4 %de MG.
  - Yaourt partiellement écrémé: c'est un produit qui renferme au moins 3 % (en poids) de MG. (Guyot ; 1992).
  - Yaourt écrémé (maigre): le produit contient au minimum 0.5% (en poids) de MG et de 0.05 à 0.1 % de protéine.

### **9. Activité antimicrobienne :**

Le yaourt à un rôle préventif contre les infections gastro-intestinales. L'intérêt du yaourt dans le traitement des diarrhées infantiles a été démontré par de nombreuses auteures. En do hors de l'acide lactique. Les bactéries du yaourt produisent des substances antimicrobienne et des prébiotiques; notamment des oligo saccharides.

L'objectif de notre étude est l'analyse de deux différentes huiles de pépins de raisin du genre (*Vitis vinifera L*), qui s'articule en trois étapes :

- A. Analyses physico-chimiques de l'huile de pépin de raisin;
- B. Analyses microbiologiques (aromatogramme);
- C. ET une partie de préparation de yaourt et le suivi de son acidité.

**Partie A : étude comparative de deux différentes huiles de pépins de raisin (de différentes variétés issues de 2 régions) :**

Cette partie vise à extraire et caractériser l'huile de pépin de raisin.

### I. Matériel végétal et préparation de la matière première

#### 1. Matériel végétal

Le fruit (raisin) utilisée pour notre étude *Vitis vinifera L* a été récolté à la compagne de 2017 en mi d'aout et le debut de septembre, les deux cépages sont de la région d'ouest, le premier cépage au niveau de la wilaya de Sidi Bel-Abbès, et le deuxième au niveau de la wilaya de Mascara.



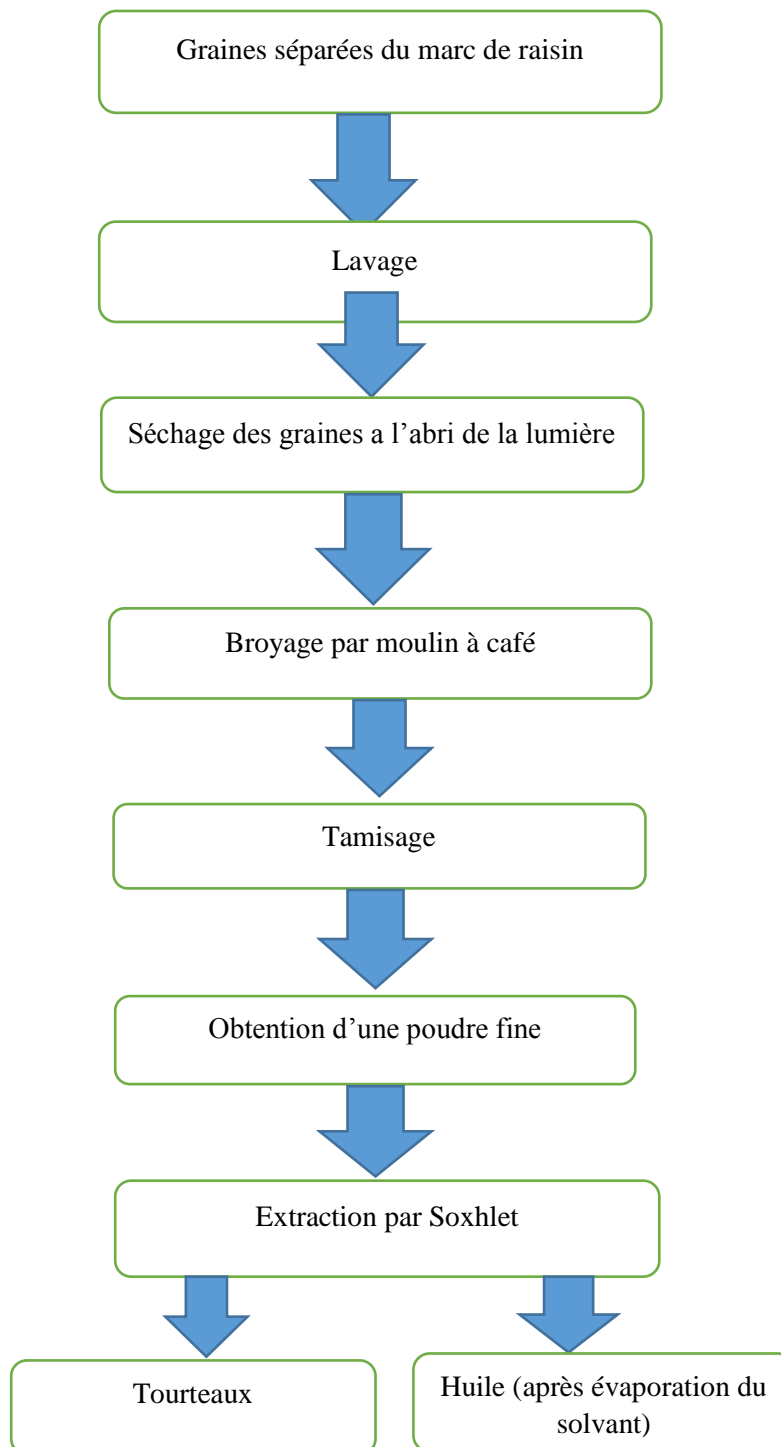
Pépins de raisin de Mascara

Pépins de raisin de Sidi Bel-Abbès

**Figure13:** représente les cépages des pépins de raisin des deux différentes régions la première de la wilaya de Mascara et la deuxième de Sidi Bel-Abbès.

## 2. Préparation de la matière première :

Les différentes étapes de la préparation d'huile sont données dans le diagramme:



**Figure14** : Diagramme d'extraction de l'huile.

## 2.1. Extraction d'huile par soxhlet et détermination de la teneur en matière grasse

### 1. Extraction de l'huile par soxhlet

L'extraction par solvant organique spécifique (n-hexane) pour la détermination du taux de la matière grasse est réalisée dans un appareil de type soxhlet. Cette technique assure une extraction à chaud des matières grasses contenues dans un échantillon végétal solide placé dans une cartouche de cellulose et imbibée continuellement par les vapeurs d'un solvant choisi en fonction de la polarité des principes actifs lipidiques à extraire. Elle a été effectuée selon la méthode **ISO 659-1988**.

Environ 20g de l'échantillon broyé (poudre de pépin de raisin) de la granulométrie inférieure à 0,5 mm sont pesés dans la cartouche en cellulose fermée par du coton cardé, et introduit dans un soxhlet. L'extraction est réalisée par du n-hexane (300ml) porté à reflux à 70°C pendant 6 heures, le solvant est ensuite éliminé par évaporation à l'aide d'un rota vapeur à 65°C.



**Figure15:** Image représentative du soxhlet.

### 2. Détermination de la teneur en matière grasse (ISO 659, 1988) et le poids de mille graines:

#### ➤ Taux de matière grasse:

Le taux de matière grasse est calculé par la méthode suivante:

$$\text{MG \%} = \frac{\text{P2} - \text{P1}}{\text{M}} * 100$$

Soit :

**MG** : Taux de matière grasse ;

- P1** : Poids du ballon vide ;  
**P2** : Poids du ballon après évaporation ;  
**M** : Masse de la prise d'essai.



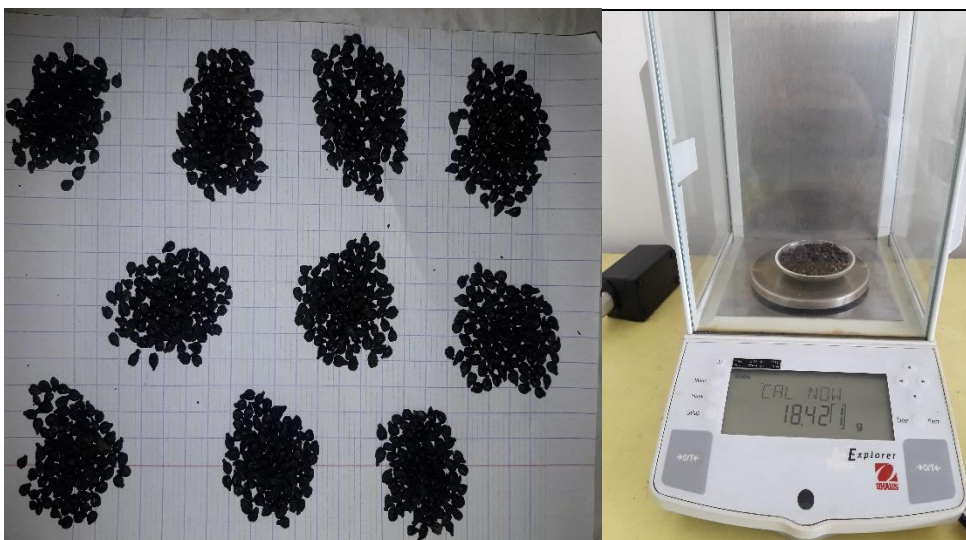
**Figure16:** image d'un rotavapeur (pour l'évaporation du solvant utilisé).

➤ **Le poids de 1000 graines:**

Le poids de mille graines est un paramètre physique qui renseigne sur la dimension des graines et leurs calibres (Godon, 1991).

➤ **Mode opératoire:**

Le poids de mille graines a été effectué conformément à la norme **NA 730. 1991.ISO 520**. C'est la masse de mille graines entières exprimée en gramme, le comptage des graines a été fait à la main et sont pesées à l'aide d'une balance de précision.



**Figure17:** image représente le comptage des 1000 graines.

Après extraction de l'huile une étude de la composition chimique et des propriétés physiques est nécessaire pour savoir à quel domaine cette huile pourra être utilisée.

### 3. Le taux d'humidité et le poids sec de la poudre de pépin de raisin:

La teneur en matière sèche (poids sec) de l'échantillon est déterminée en séchant 5 gr de produit à l'étuve réglée à une température de 105 C° pendant 16h (AFNOR; 1985).

- La première étape consiste à peser la matière brute. Pour cela, on a pesé 10 gr de chaque échantillon à l'aide d'une balance de précision. L'aliquote est mise dans une montre en verre. La montre doit être pesée préalablement et étiquetée.
- La deuxième étape c'est la déshydratation de l'aliquote à l'étuve (105 C° pendant 24h).
- Après 24h les montres ont été refroidies dans un dessiccateur pendant 45 min, la matière sèche restante est alors pesée par différence avec la masse initiale, la quantité d'eau évaporée est ainsi déduite (taux d'humidité).

Le calcul:

Poids sec (gr) = pesée des montres après séchage – pesée des montres vides

**Poids sec %** = poids sec (gr) \* 100 / 10 (gr) (le poids de l'aliquote)

Taux d'humidité (gr) = poids sec (gr) – 10 (gr) (le poids de l'aliquote)

**Taux d'humidité %** = taux d'humidité (gr) \* 100 / 10 (gr) (le poids de l'aliquote).

### 4. Caractérisation de l'huile et de graine de pépin de raisin:

#### Les analyses physico-chimiques:

##### 1. Indice de réfraction de l'huile:

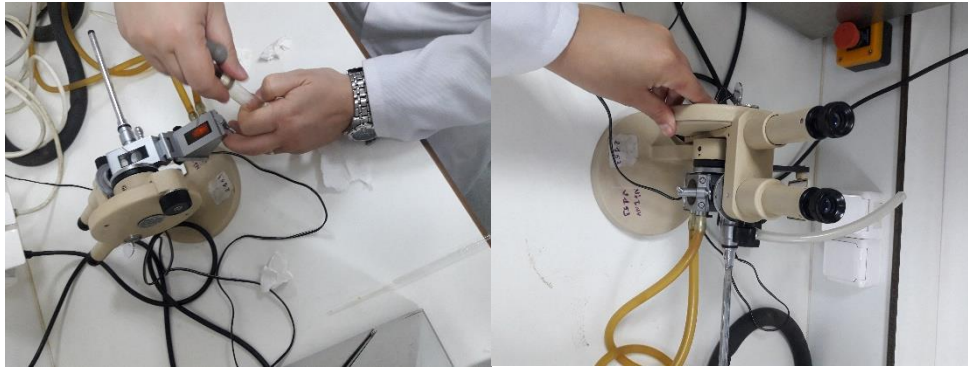
L'indice de réfraction d'une substance est le rapport de la vitesse de la lumière à une longueur d'onde définie dans le vide à sa vitesse de propagation dans la substance. Il est déterminé à l'aide d'un réfractomètre à température 20°C selon la norme (NF ISO 6320, janvier 1996).

##### ➤ Le mode opératoire

Pour mesurer l'indice de réfraction des huiles, nous avons utilisé un réfractomètre. Sur la section plane d'un prisme en verre, nous avons placé une goutte d'huile dont nous voulons mesurer l'indice de réfraction. L'appareil est éclairé avec une source étendue donnant des rayons lumineux de direction variée, focalisées au centre. Nous observons ainsi deux plages l'une est claire l'autre est sombre.

La limite de séparation de ces deux plages permet de déterminer l'indice de réfraction de

notre huile.



**Figure18:** image représente un réfractomètre.

## 2. Dosage spectrométrique des phénols totaux de l'huile :

### ➤ Préparation de l'extrait méthanolique de l'huile :

1 gr d'huile de pépin de raisin a été pesée dans un tube à l'aide d'une balance de précision et mélangée avec 3 ml de méthanol / H<sub>2</sub>O 90 :10 (v/v), le mélange a été bien mélangé à l'aide d'un vortex pendant 4 min et puis centrifugé 5 min à 3000 G, après récupération du surnageant, l'extraction a été répétée 3 fois, et les extraits ont été combinés. L'extrait final obtenu a été concentré et dissous dans du méthanol et stocké à - 20 °C. (Bail 2008)

### ➤ Détermination de la teneur totale en composés phénoliques de l'huile :

200µl de l'extrait méthanolique de l'huile a été ajouté à 4 ml de H<sub>2</sub>O et 0,25 ml de réactif de Folin, laissé 5min à l'abri de la lumière, après on ajoute 1 ml de Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub> (7,5%), le mélange a été agité. Après une incubation de 60 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière l'absorbance par rapport à l'ébauche préparée a été enregistrée à 765 nm en utilisant un spectrophotomètre.

## 3. Dosage spectrométrique des pigments dans l'huile :

0,2 gr d'huile extraite a été ajoutée à 2 ml de cyclohexane, ce mélange été bien agité à l'aide d'un agitateur. La lecture de l'absorbance à 670 nm pour la chlorophyll et 470 pour le caroténoïde. Le taux des pigments est calculé par les formules suivantes:

Chlorophyll: (mg/kg d'huile) = (A 670\* 10<sup>6</sup>) (613\* 100\*d)

Carotenoids: (mg/kg d'huile) = (A 470\* 10<sup>6</sup>) (2000\* 100\*d)

(d = 1cm, 613 est le coefficient d'extinction de la chlorophyll; Et 2000 le coefficient d'extinction de caroténoïde).

#### 4. Dosage spectrométrique des phénols totaux de la graine:

##### ➤ Principe:

Les composés phénoliques réagissent avec le réactif de Folin-Ciocalteu's. Ce dernier est composé d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolibdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) qui se réduit, Lors de l'oxydation des polyphénols, en oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). Cette réaction développe une coloration bleu qui est proportionnelle au taux des composés phénoliques oxydés (**Drali Manel et al, 2017**).

##### ➤ Extraction méthanolique des graines de pépin de raisin:

L'extraction des composés phénoliques des graines de raisin a été réalisée par ultrasonication, en utilisant l'acide chlorhydrique dans le méthanol comme solvant d'extraction.

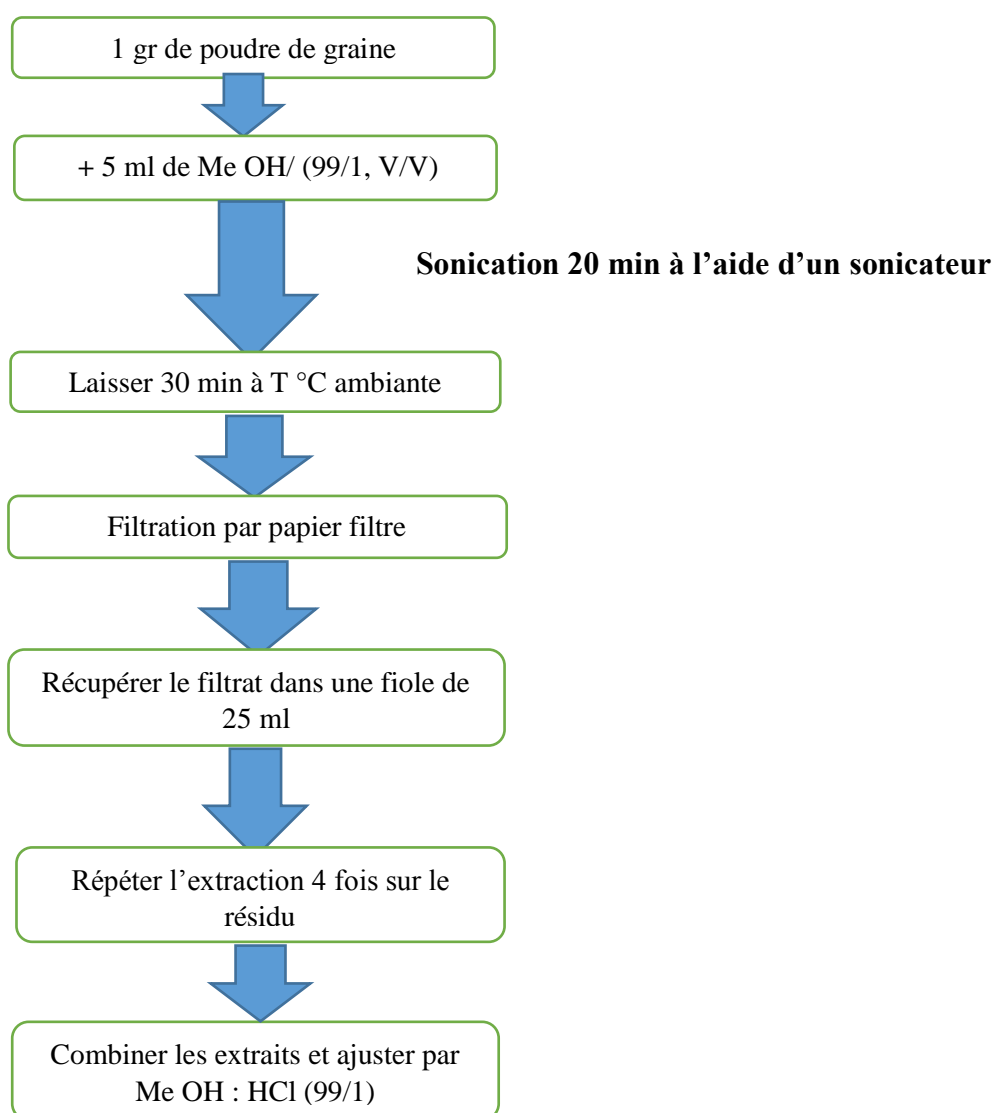
Les graines broyées en poudre, ont été pesés (1,0 g) et mélangés avec 5 ml de méthanol / HCl 99/1 (v / v) pour l'extraction par solvant.

Ces échantillons ont été placés dans des tubes à essais de 20mL, ont été immergés dans un bain à ultrasons et soumis à un traitement par ultrasons à 25 ° C et à une fréquence constante de 35 kHz (350 W) pendant 20 min, puis les échantillons ont été retirés et laissés à température ambiante pendant environ 0,5 h. L'extrait a été filtré et recueilli dans une fiole de 25 ml. La méthode d'extraction mentionnée ci-dessus a été suivie quatre fois sur les résidus restants et les extraits ont été combinés et ajustés jusqu'à 25 ml par du méthanol / HCl (99: 1

v / v) **Farhadi.K et al, 2016**.



**Figure 19:** image représente un sonicateur.



**Figure20** : Diagramme d'extraction des polyphénols totaux des graines de pépin de raisin

(Farhadi.K et al, 2016).

➤ **Détermination de la teneur totale en composés phénoliques des graines :**

La teneur en composés phénoliques totaux des extraits a été déterminée à l'aide de colorimétrie Folin-Ciocalteu. Méthode (Singleton, & Rossi, 1965).

L'acide gallique a été utilisé comme étalon.

Les résultats ont été exprimés en équivalents d'acide gallique (mg d'acide gallique / g d'échantillons séchés). Pour cela La purification de l'aliquote (40  $\mu$ L) d'un extrait méthanolique a été ajoutée à 1,0 mL de Folin-Ciocalteu réactif (dilué dans un rapport de 1:10). Le mélange a ensuite été secoué et laissé reposer pendant 6 minutes, avant d'ajouter 0,8 ml de solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 7,5%. Après une

incubation de 30 minutes à 25 ° C, l'absorbance par rapport à l'ébauche préparée a été enregistrée à 765 nm en utilisant un spectrophotomètre.



**Figure21:** image d'un spectrophotomètre.

### ➤ Expression des résultats

La teneur en polyphénols totaux, est déterminée à partir d'une équation de la régression linéaire déduite de la courbe d'étalonnage (voir Annexe) et exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique (SM 20 mg/ 50 ml).

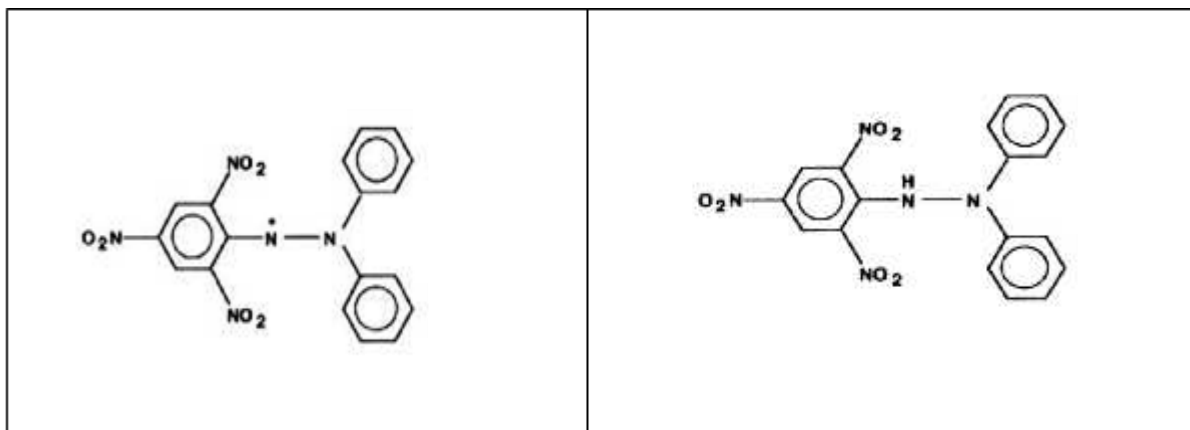


**Figure22:** représente les extraits obtenus (V<sub>2</sub> est plus foncé que les V<sub>1</sub>).

### 5. Pouvoir antioxydant: piégeage de radical libre DPPH de l'huile:

La présence de différents composés antioxydants dans les tissus de la plante rend difficile leurs quantification chacun séparé (Djeridane et al., 2006).

le radical stable (DPPH) ou diphenylicrylhydrazyl à été généralement utilisé pour la détermination d'une activité antioxydante primaire (Wong et al., 2006).



**Figure23:** Structure chimique du radical libre DPPH et sa forme réduite (Drali. M et al, 2017).

➤ **Principe:**

Sous l'effet des antioxydants, le DPPH, est réduit en passant de sa couleur violette à la couleur jaune. Dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Drali. M et al, 2017)

➤ **Préparation de la solution DPPH:**

Une solution de DPPH 0,1mM est préparée en ajoutant 50 ml de méthanol à 1,9716 mg de poudre de DPPH sous agitation magnétique pendant une demi heure, mettre la préparation à l'abri de la lumière pendant 2 heures. La solution obtenue est de couleur violette : c'est le DPPH méthanolisé.

➤ **Mode opératoire:**

On a pris des différentes concentration des l'extrait méthanolique de l'huile dans des tubes a essais et on a ajusté par le MeOH jusqu'a 2ml, ensuite on a ajouté 1 ml de la solution DPPH 0,1 Mm fraîchement préparée. Après agitation par un vortex les tubes ont été placés à l'obscurité et à temperature ambiante pendant 30 min. Une mesure de l'absorbance a été effectuée à 517 nm. En parallèle, un témoin a été préparé. Ce dernier est préparé en mélangeant 2ml du méthanol avec 1ml de la solution méthanolique de DPPH.

L'activité antioxydante, qui exprime la capacité de piéger le radical libre est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH.

➤ **Expression des résultats**

La concentration d'inhibition des radicaux libre (IC) exprimé en pourcentage est calculée selon la formule suivante :

$$IC\% = (\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle} \times 100$$

Avec :

**Abs contrôle** : Absorbance du contrôle (DPPH méthanolisé) ;

**Abs échantillon**: Absorbance pour chaque dilution.



**Figure 24:** image représente les différentes concentrations et la décoloration du DPPH.

## Partie B: Evaluation de l'activité antibactérienne:

### 1. Les souches utilisées:

Les souches qui ont été testées pour déceler l'activité antibactérienne de l'huile de pépin de raisin étaient disponibles au laboratoire de microbiologie du département de biologie à l'université de Mostagaem.

Deux souches à Gram négatif : E.coli et Staphylococcus

Et une souche Gram positif: Salmonelle

### 2. Isolement et purification :

Les souches sont repiquées sur le bouillon nutritif et mises à l'étuve à 37°C/24 heures puis ensemencées sur une boîte de Pétri contenant la gélose nutritive.

Un repiquage successif sur bouillon nutritif et sur gélose nutritive est effectué en prenant soin de prendre à chaque fois une colonie distincte et isolée.

La purification est suivie par l'étape d'identification par un examen de la morphologie, la coloration de Gram et les tests biochimiques.

#### ➤ Activité antibactérienne :

Le milieu de culture utilisé est Gélose de Mueller Hinton (milieu de référence pour les tests antibactériens), a été préparé et stérilisé

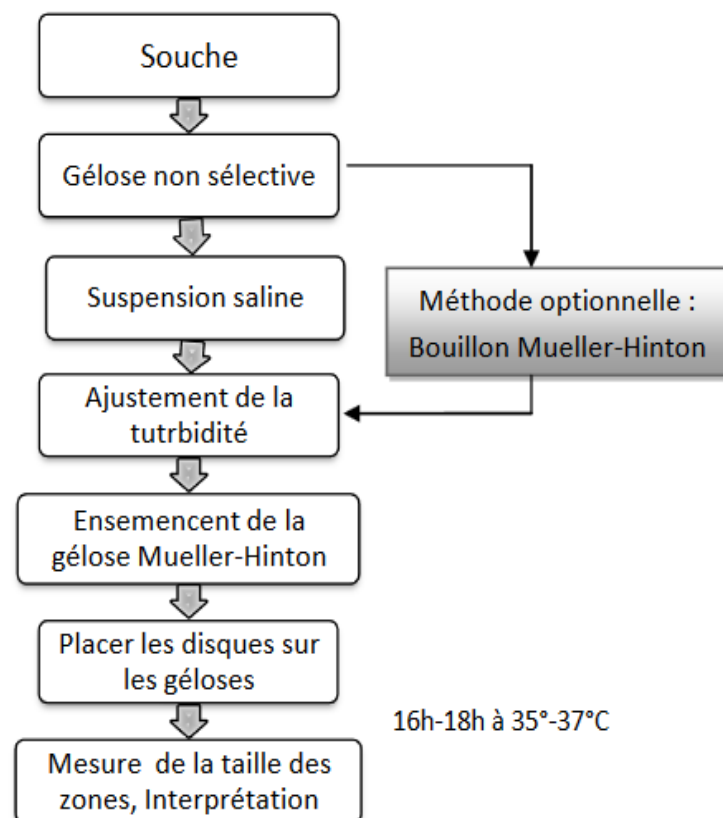
### 3. Inoculum

Les trois souches bactériennes purifiées sont mises en culture séparément à 37°C/24 heures sur un bouillon nutritif puis ensemencées sur une gélose nutritive à 37°C/24h.

L'étape suivante vise à préparer l'inoculum en prélevant une à deux colonies et les suspendre dans 9 ml d'eau physiologique stérile (9g NaCl/l).

L'inoculum peut être ajusté en ajoutant de la culture si la DO est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile si elle est trop forte (Aboun et al. 2001, Abi-ayad, 2009).

L'inoculum ainsi préparé est ensuite dilué au 1/100<sup>e</sup> dans l'eau physiologique donnant une densité bactérienne de 10<sup>6</sup>UFC/ml. Pour les staphylocoques, l'inoculum est ajusté à 10<sup>7</sup> UFC/ml (la technique de diffusions) (Soussy, 2003).



**Figure25:** Diffusion en gélose par la méthode des disques (Jorgensen et al., 1999; NCCLS, 1999).

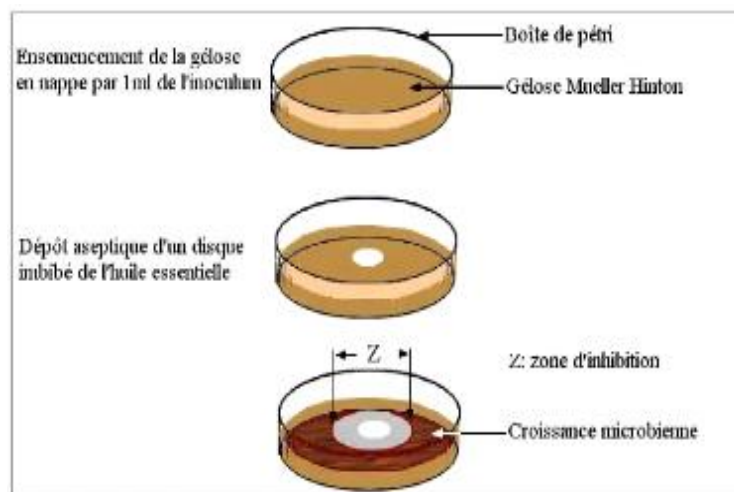
L'activité antibactérienne est considérée comme positive à partir d'un diamètre supérieur à 6 mm (Parck et al., 2006; Nath et al., 2008; Rahmoun, 2009). Ce produit peut avoir:

- Très forte activité : diamètre  $\geq 30$  mm;
- Forte activité diamètre 21-29 mm;
- Moyenne activité: diamètre 16-20 mm;
- faible activité diamètre 11-15mm;
- Petite ou pas d'activité : diamètre  $\leq 10$  mm.

➤ **principe de fonctionnement:**

On ensemence une boîte de Pétri avec le germe à étudier. Différentes huiles essentielles sont mises en contact direct ou indirect, puis la boîte est remise en étuve. Au bout de quelques heures, le résultat est déjà visible.

La mesure du halo d'inhibition que crée chaque huile essentielle autour d'elle est mesurée en mm et retranscrite en – (inactive), + (faiblement active), ++ (activé moyenne), +++ (active) et ++++ (très active).



**Figure26:** représente un aromatogramme (methode des disques).

**Parite C : Préparation d'un yaourt étuvé:**

1. La préparation du lait: nous avons mélangés 140 gr de poudre de lait commercialisée dans 1 litre d'eau minérale tiède (45°C) dans, et nous avons bien homogénéisé.
2. La pasteurisation du lait préparé: consiste à chauffer le lait jusqu'à 85°C pendant 20 secondes. Elle est effectuée sur une plaque chauffante afin d'éliminer les micro-organismes présents dans le lait et indésirables pour l'homme.
3. L'ensemencement : avant d'être ensemencé, le lait est refroidi et maintenu à une température de 43°C (à la température à laquelle les ferments lactiques commencent à fonctionner). L'ensemencement consiste ainsi à introduire des ferments lactiques spécifiques dans le lait, afin que celui-ci prenne une nouvelle consistance. Les règles de fabrication d'un yaourt sont ainsi strictes: pour faire un yaourt on doit introduire deux types de ferments lactiques, le *Lactobacillus bulgaricus* et le *Streptococcus thermophilus*.
4. L'étuvage: une fois ensemencé, le lait est réparti dans des pots transparents stériles de capacité

de 100ml, recouverts d'un film aluminium pour assurer l'anaérobiose. Incuber les échantillons à 40 °C pendant 4 h

5. Les yaourts sont conservés à 6°C au réfrigérateur durant toute la période de post-acidification. Le yaourt étuvé sa fermentation se fait dans des pots et son acidité est égale 80 – 90 °D.



**Figure27** : représente le yaourt préparé (le témoin).

### 1. Le titrage d'acidité du yaourt:

#### ➤ Principe et mode opératoire :

Pour doser l'acide lactique (acide faible) dans le yaourt, composé qui apporte les ions  $H^+$  on peut utiliser une base forte ( $Na^+$ ,  $OH^-$ ) qui capte les ions  $H^+$  dont on connaît la concentration. À l'équivalence le nombre de moles de protons ( $H^+$ ) apportés par l'acide lactique est égal au nombre de moles de protons captés par la base.

#### Dosage :

- Matériels: erlenmeyer, pipette jaugée 10ml, éprouvette graduée, burette graduée, bécher.
- Produits utilisés: nos échantillons de yaourt (témoin, 1%, et 2%), hydroxyde de Sodium ( $Na^+$ ,  $OH^-$  1/9 N), indicateur coloré (Phénophtaléine: solution 1g dans 100ml d'éthanol à 95-96% (en volum)) et pissette à l'eau distillée.
- On a rincé et rempli la burette par la solution de NaOH (la concentration connue N/9) On a ajusté le niveau du liquide à zéro (Le bas du ménisque doit affleurer le trait 0).
- On a bien mélangé le yaourt à l'aide d'une cuillère.
- À l'aide de la pipette de 10 ml, on a prélevé 10mL de l'échantillon et on les a transférés dans l'erlenmeyer. Puis on a ajouté 2 gouttes de phénophtaléine (indicateur xde fin de réaction) et on a procédé au dosage, jusqu'à l'apparition d'une couleur très légèrement rose persistante 30 s. On a fait trois essais pour chaque échantillon.

### 1. La teneur en matière grasse (Rendement):

L'huile a été extraite des pépins de raisin par la méthode soxhlet, en utilisant le N – Hexane comme solvant. D'autres solvants d'extraction sont décrits dans la littérature tels que l'éther de pétrole (35- 60 °C), le cyclohexane, et le chloroforme (60, 5 - 61, 5°C) (Adrian et al., 1998). Dans notre travail, nous avons préféré effectuer l'extraction avec l'hexane à 69 °C,

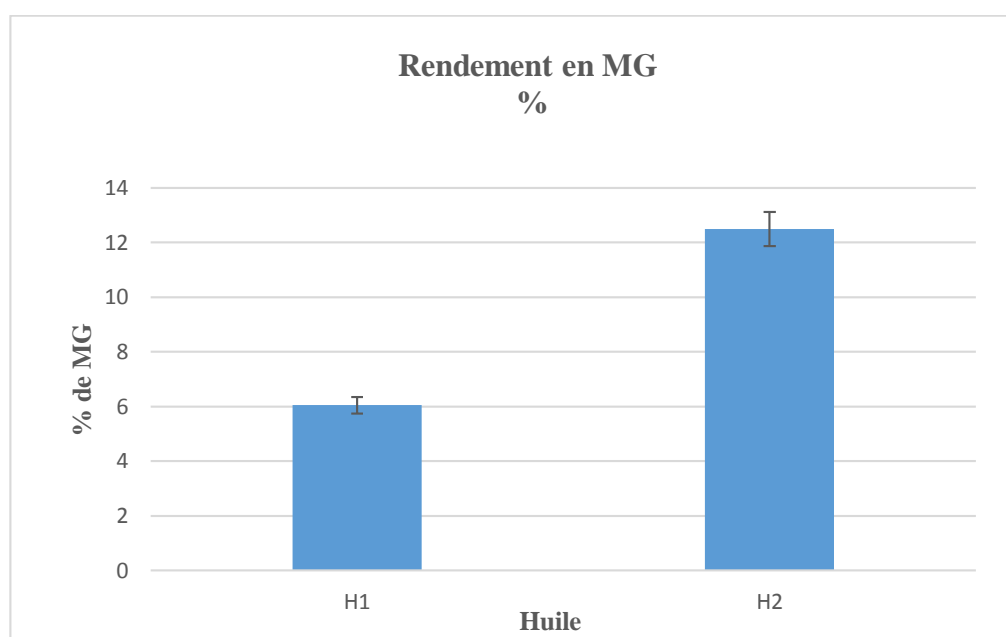
La teneur en matière grasse est illustrée dans le tableau suivant:

→ H1: Sidi Bel-Abbès

→ H2: Mascara.

	H1	H2
Rendement en MG (%)	6,04666667 ± 0,33	12,48666667 ± 1,08

**Tableau 11:** Rendement de l'huile extraite des pépins de raisin.



L'huile extraite à partir des pépins de raisin est une huile fluide, relativement inodore et avec une couleur allant du jaune foncé au verdâtre, cela est expliqué par la présence d'éléments chimiques comme les chlorophylles et les caroténoïdes (pigments)

Notre huile présente un rendement d'extraction de 6, 05% (huile extraite des pépin de raisin de la region de Sidi Bel-Abbès), et de 12, 50% (de la région de MASCARA).

Cette différence peut être due au facteur génotypique, ou bien aux conditions pédoclimatiques, car les deux huiles extraites sont de deux différentes régions, et aussi la période de récolte du raisin normalement juste après la compagne (les pépins sont plus riche en MG et leurs rendement est

meilleur), il faut séparer les pépins du marc et les bien séchés à l'abri de la lumière, afin d'avoir plus de rendement de lipides. Il est cependant souhaitable de sécher les pépins à la plus basse température possible (température ambiante) ce qui permettrait d'éviter toute dégradation qualitative de l'huile. Le rendement en huile des pépins de Sidi Bel-Abbès est inférieur à celui des pépins de Mascara. La différence est assez significative, elle est de l'ordre de 6%.

Selon (Cabanis et al., 1998), la teneur en MG des pépins de raisin est de 8 – 13 %.

➤ Mode de conservation de l'huile de pépins de raisin:

L'huile extraite est stockée au réfrigérateur à l'abri de la lumière et de l'humidité dans des tubes à essais en verre (couvrés par du papier aluminium).

Une analyse physico-chimique et une étude de l'activité antimicrobienne (antibactérienne) est réalisée sur l'huile de pépins de raisin.

## 2. Le poids de mille graines

	Poids de milles graines (gr)
Pépins de raisin 1 de Sidi Bel-Abbès	17,427 ± 0,67
Pépins de raisin 2 de MASCARA	18,45 ± 0,39

**Tableau 12:** Le poids de mille graines (PMG).

## 3. L'indice de refraction:

L'indice de réfraction « R » des huiles varie en fonction de leurs insaturations. Il croît avec le degré d'insaturation des acides gras contenus dans les matières grasses.

En fonction de l'indice de réfraction, on peut classer les corps gras en deux groupes

(Adrian et al., 1998 )

- Les graisses lauriques végétales: dont l'indice de réfraction est compris entre  $R = 1,448$  et  $R = 1,458$ .
- Les huiles végétales dont l'indice de réfraction est compris entre  $R = 1,468$  et  $R = 1,490$ .

Dans notre cas, l'indice de réfraction mesurée de l'huile de pépins de raisin est dans le tableau suivant:

	Huile 1	Huile 2
Indice de refraction (R)	1,441 (68%)	1,446 (70%)

**Tableau13:** l'indice de refraction de l'huile de pépin de raisin.

Cette valeur est en accord avec d'autres auteurs qui donnent une valeur de l'indice de réfraction autour de  $R = 1,474$  (Abu nasr, 1953; Akpambang, 2008)

Ollé (2002) a proposé une classification des huiles en fonction de leur composition en acide gras majoritaire (acide oléique, acide linoléique, acide linoléique) et leur indice de réfraction.

A titre comparatif, on donne les indices de réfractons de quelques huiles végétales (voir tableau

Différentes huiles	Indice de réfraction	Classification des huiles (Ollé)
Olive	1,466-1,468	Huile riche en acide oléique <b>1,468&lt;R&lt;1,472</b>
Tournesol	1,472	Huiles riches en acide linoléique <b>1,471&lt;R&lt;1,477</b>
Argan	1,4711	
Coloquinte	1,474	
Nigelle	1,472	
Sésame	1,470	
Pépins de raisin	1,464 - 1,471	
Foie de morue	1,481	Huiles riches en acide linoléique <b>1,480&lt;R&lt;1,523</b>

**Tableau 14:** Indices de réfraction de quelques huiles.

La lecture de ce tableau nous permet de prévoir de façon approximative que l'huile de coloquinte contiendrait majoritairement l'acide linoléique.

#### 4. Le taux d'humidité et le poids sec (%):

	Echantillon 1	Echantillon 2
Taux d'H %	11,644	14,516
Poids sec %	88,355	85,484

**Tableau15:** le taux d'humidité et le % du poids sec de poudre de pépins de raisin.

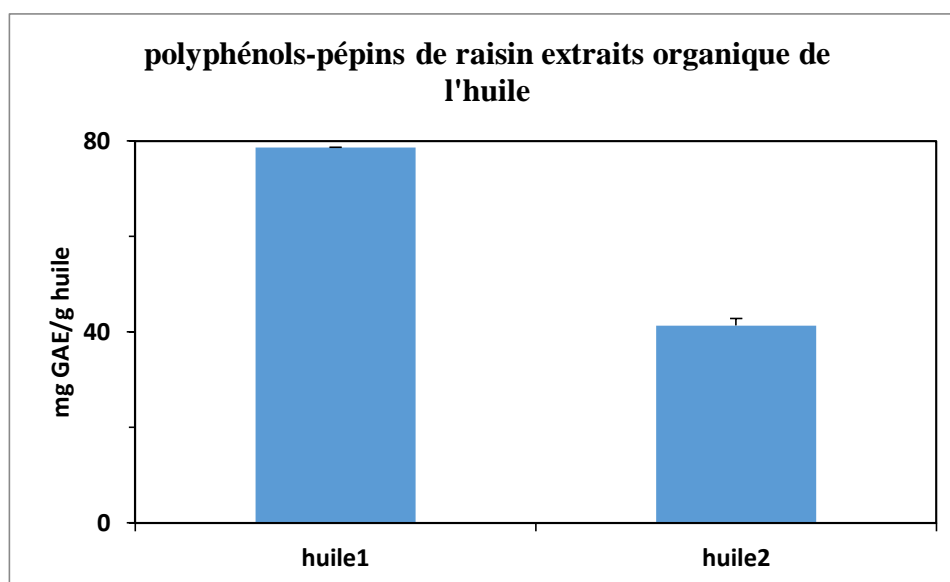
Des travaux de la littérature, effectués sur d'autres types de graines, suggèrent de les sécher à des température de 80-100°C avant toute extraction, dans le but d'éliminer le maximum d'eau et augmenter ainsi les rendements par rapport à la matière sèche (Haidara, 1996).

Selon nos résultats, on constate que les pépins de la région de Mascara (echantillon 2) sont plus humides que les pépins de Belabes (echantillon 1).

### 5. Dosage spectrométrique des phénols totaux dans l'huile:

	Huile 1	Huile 2
Polyphénols mg GAE/g d'huile	78,58 ± 0,07	41,36 ± 1,50

**Tableau16:** les polyphenols dans l'huile.



Notre résultats montre que l'huile extraite des pépins de raisin de Belabes est riche en polyphenols (78,58 mg GAE/g huile) que la deuxième huile (41,36 mg GAE/g huile).

Selon (*Bail et al., 2008*) les polyphenols de l'huile de pépin de raisin varie selon les variétés de 59 à 115,5 µg/g GAE

### 6. Dosage spectrométrique des pigments dans l'huile :

**La chlorophylle:** est le principal pigment assimilateur des végétaux photosynthétiques.

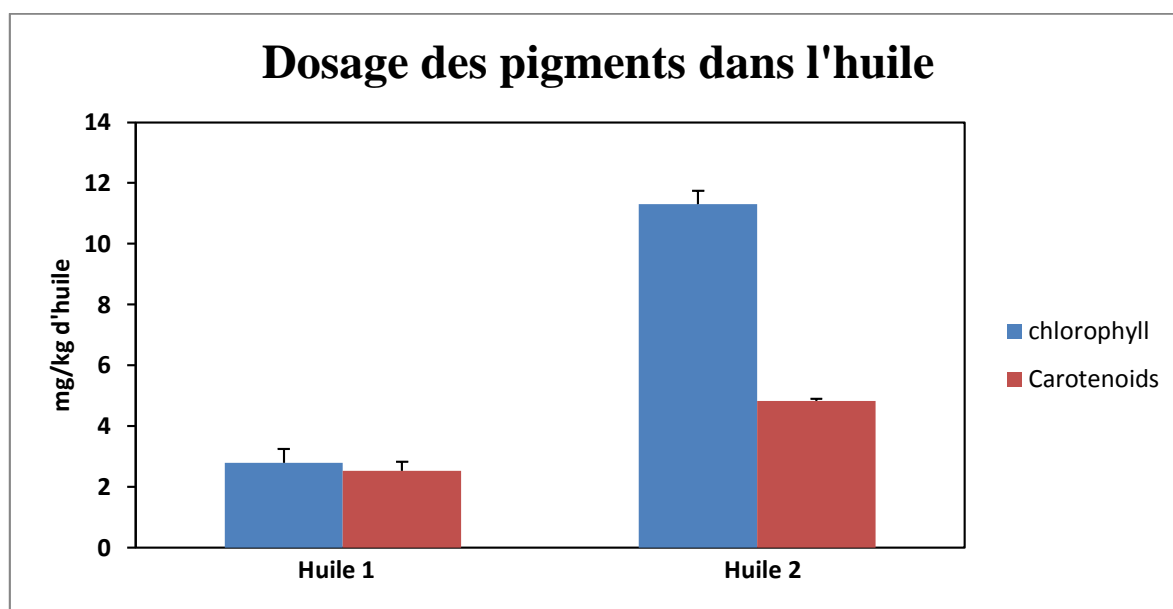
Isolé en 1816 par Joseph Bienaimé Caventou et Joseph Pelletier, ce pigment, situé dans les chloroplastes des cellules végétales, intervient dans la photosynthèse. Son spectre d'absorption du rayonnement lumineux est responsable de la couleur verte des végétaux ; la longueur d'onde la moins absorbée étant le vert, c'est donc cette couleur qui est perçue dans la lumière réfléchiée vers l'œil par la feuille.

**Les caroténoïdes:** jouent un rôle important dans la nutrition et la santé, car plusieurs sont des provitamines A, et certains présentent aussi des activités anti-cancer et antioxydantes. Ces composés bioactifs stimulent en outre la synthèse d'anticorps.

certaines d'entre eux sont largement utilisés dans l'industrie agroalimentaire pour leurs propriétés colorantes, et également dans les industries cosmétique et pharmaceutique pour leurs propriétés antioxydantes et leur capacité de photoprotection.

	Huile 1	Huile 2
Chlorophyll (mg/kg d'huile)	2,80	11,31
Carotenoids (mg/kg d'huile)	2,53	4,83

**Tableau 17:** le taux des pigments dans l'huile de pépin de raisin.



On Remarque que l'huile des pépins de raisin de Mascara (Huile 2) est riche en chlorophyll et carotenoids par rapport a l'huile de Belabes (Huile 1).

Selon (Giuffrida, Salvo La pera and Dugo 2007) la chlorophylle est de 3,8 mg/kg d'huile d'olive (selon les variété, et la méthode de dosage des pigments).

Selon (H. Ben Mohamed et al., 2016) le dosage des pigments varie selon la méthode d'extraction de l'huile et les différents variétés de raisin ( les resultats sont dans un tableau annexe N°6).

### 7. Dosage spectrométrique des phénols totaux de la graine:

La teneur totale en polyphénols (TPC) des extraits mesurés par la méthode de Folin-Ciocalteu. Le dosage des polyphénols totaux nous donne une estimation globale de la teneur en différentes classes des composés phénoliques.

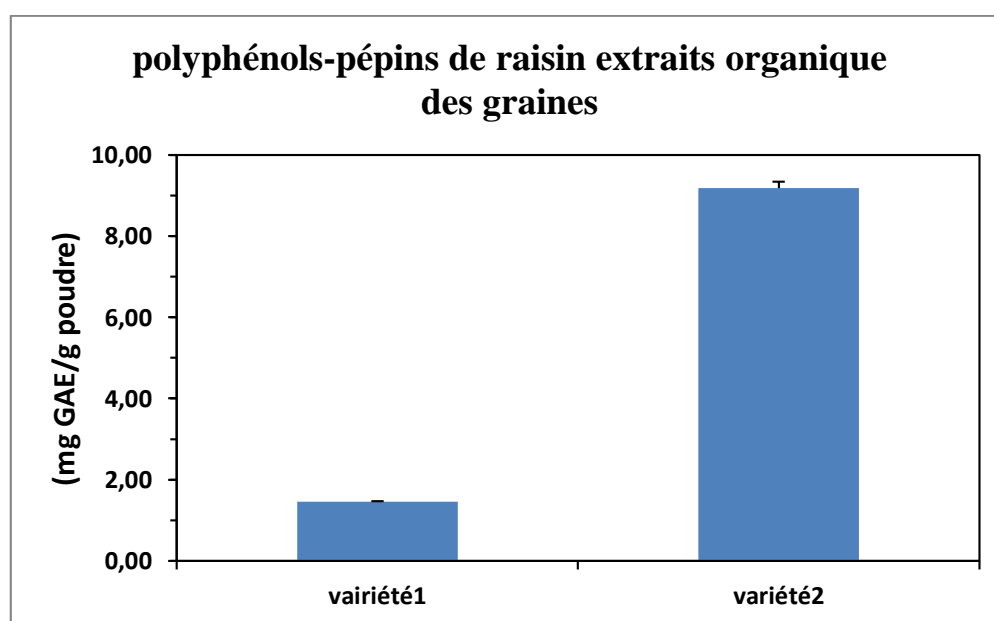
Après extrapolation des résultats de la DO sur la courbe d'étalonnage, la teneur en composés phénoliques totaux dans notre échantillon est estimé à 1,46 mgGAE/g d'MS poudre de pépins de

raisin pour la variété de Belabes et à 9,19 mgGAE /g de poudre de pépins de raisin de Mascara, d'après le tableau annexe N°2, on constate que notre graine est une faible source de polyphénols par rapport aux résultats qui montrent des différences significatives ( $P < 0,05$ ) entre le contenu total des composés phénoliques dans les extraits des cultivars pour chacune des sections. (K. Farhadi et al., 2016)

Selon, **Macheix et ses collaborateurs (1990)**, la concentration des polyphénols varie d'une espèce à une autre durant le stockage par les différentes voies de brunissement.

Les variétés	Variété 1 (de Belabes )	Variété 2 (de Mascara)
Le taux de polyphenols mg GAE/g de de poudre de pépin de raisin	1,46 ± 0,01	9,19 ± 0,15

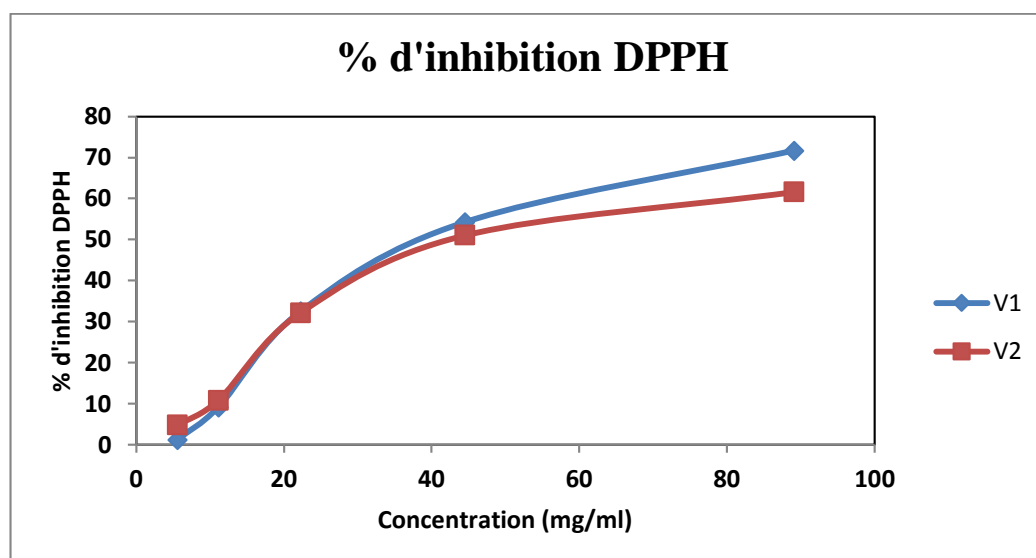
**Tableau 18:** Taux de polyphenols dans les graines de raisin.



#### 8. Pouvoir antioxydant: piégeage de radical libre DPPH de l'huile:

Pour évaluer le pouvoir antioxydant de l'huile de pépins de raisin, nous avons utilisé la méthode de DPPH. Ce radical libre présente une coloration violette, lorsque il est piégé par des substances antioxydantes la forme réduite confère à la solution une coloration jaune, le virage de cette coloration et l'intensité de la décoloration de la solution dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance antiradicalaire.

Selon nos résultats on constate que le % d'inhibition DPPH de l'huile 1 (v1) est de 71% pour 89,08 mg/ml d'huile et de 61% pour l'huile 2 (v2) pour la meme concentration.



### 9. Evaluation du pouvoir antibactérien de l'huile:

L'aromatogramme est un moyen de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles. C'est un examen de laboratoire qui ressemble à un antibiogramme mais où les antibiotiques sont remplacés par des huiles essentielles préalablement sélectionnées et de composition biochimique connue grâce à des analyses de laboratoire (chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse).

L'aromatogramme permet de déterminer l'efficacité *in vitro* des huiles essentielles. Les résultats obtenus permettront de préparer avec précision une synergie d'huiles essentielles afin de lutter contre le germe en cause.

Ce travail avait pour but de démontrer si l'huile de pépins de raisin a un pouvoir antibactérien sur les souches bactériennes pathogènes. Pour cela, nous avons choisi la méthode de diffusion (l'aromatogramme) pour évaluer l'activité biologique de l'huile.

Cette étape consistait à mesurer la sensibilité des bactéries à l'huile pure; dans ce cas on a utilisé la méthode de diffusion sur gélose. Des disques imprégnés de l'huile avec 2 gouttes sur la gélose Mueller-Hinton ensemencée. Après incubation, on mesure les zones d'inhibitions qui sont sous forme d'un halo clair autour des disques.

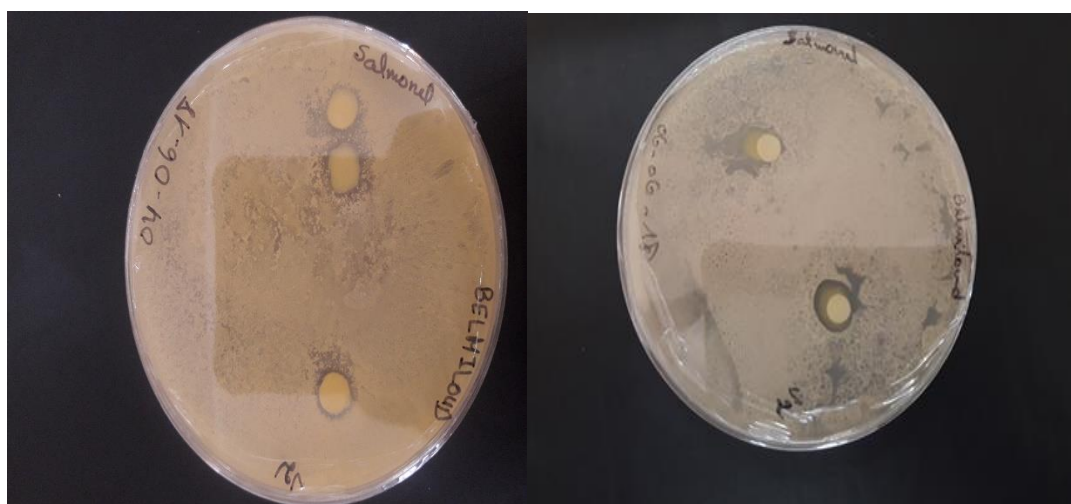
Aucune zone d'inhibition n'a été détectée pour les deux huiles à *E.Coli* et *Staphylococcus* donc on déduit que les bactéries sont résistantes vis à vis l'huile de pépin de raisin. Et pour l'huile 2 nous avons détecté une zones d'inhibition de 10mm de la souche *Salmonelle*, donc cette bactérie est sensible vis a vis l'huile 2

La mesure des disques ne fournit que des informations qualitatives sur la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes vis-à-vis du produit à tester (Hart, 1999 ; Rey, 2010).

Des travaux sont effectués sur l'huile de nigelle et l'huile d'olive, afin d'avoir une idée sur l'activité de chaque huile sur des différentes souches bactériennes:

	L'huile de coloquinte		L'huile d'olive		L'huile de nigelle (Ø en mm)	
<i>Escherichia coli</i>	6	6	6	6	10	18
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	6	6	6	11	25
<i>Bacillus cereus</i>	6	6	6	6	18	29
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	6	6	6	6	6
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	6	6	6	25	40

**Tableau19:** Résultats des diamètres des zones d'inhibitions des différentes huiles (l'huile de coloquinte, l'huile d'olive et l'huile de nigelle)( MOSTEFA-KARA Ikrame née BOUBLENZA 2011).



**Figure28:** Zones d'inhibitions de l'huile de pépins de raisin (souche salmonelle).

Zone d'inhibition est de 10mm la bactérie (salmonelle) est sensible à l'huile de pépins de raisin. (Reaction intermédiaire à l'huile de pépins de raisin). Et pour les deux autres bactéries (E.coli, Staphylococcus) il n'avait pas d'inhibition donc ces bactéries sont résistantes à cette huile.

### 10. Evolution de l'acidité °D du yaourt additionné d'huile de pépins de raisin au cours de la période post-fermentation:

Le lait est un aliment complet, ce qui signifie qu'il sera également un bon milieu pour les microorganismes, c'est ce qui fait qu'il ne se conserve pas. Un des moyens découvert par l'homme pour augmenter sa conservation est de le faire transformer de façon plus ou moins contrôlée par certains microorganismes, de façon à éviter toute autre altération. En gros, cette conservation repose sur l'élimination d'une grande partie de l'eau et sur l'acidification. défavorise le développement des microorganismes. Il est le point de départ pour tous les produits laitiers.

Le yaourt ou yoghourt est le lait fermenté le plus consommé. Il résulte de la fermentation du lait par deux bactéries lactiques thermophiles: *Streptococcus salivarius*, subsp. *Thermophilus* (anciennement dénommé *Str. thermophilus*), et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* (anciennement dénommé *L. bulgaricus*). Cette fermentation conduit à la prise en masse du lait. Le coagulum obtenu est ferme, sans exsudation de lactosérum. Il peut être consommé en l'état ou après brassage lui donnant une consistance crémeuse ou liquide. Il peut aussi être congelé et consommé comme une glace. Ces deux espèces sont microaérophiles. Elles vivent en symbiose dans le yaourt.

Nous avons choisis le yaourt par ce qu'il donne des résultats dans un temps réduit (rapide) et nous avons décidé de vérifier si l'huile de pépin de raisin a un effet de conservation sur le yaourt et aussi par ce que c'est un produit consommé en grande quantité.

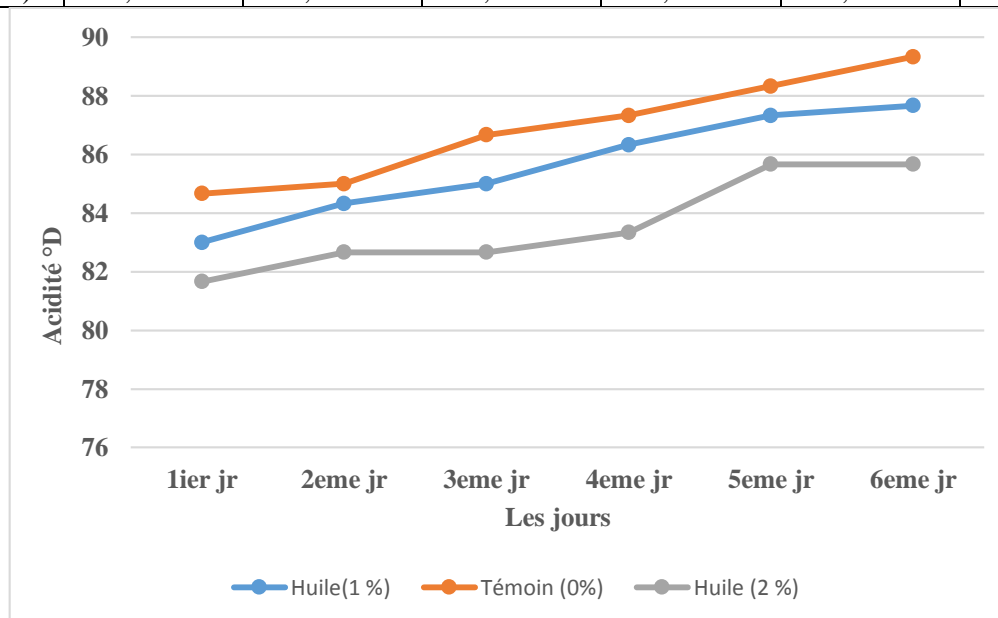
L'huile de pépins de raisin a été incorporées dans le yaourt prepare (0% de sucre) à des taux 0% pour le témoin et de 1%, 2% (pour chaque pot de 100 ml de yaourt).

La stabilité physicochimique (l'acidité) des échantillons expérimentaux a été suivie chaque jour par titrage pendant 5 jours.

L'acidité est déterminée d'une façon précise par titration de 10 ml d'une prise de yaourt à l'aide d'une soude caustique NaOH préparée à 1/9 N en présence de 2 à 3 gouttes de phénophtaléine.

## ❖ Première préparation de yaourt:

Les jours Echantillon	1ier jr	2eme jr	3eme jr	4eme jr	5eme jr	6eme jr
Huile (1 %)	83	84,3333333	85	86,3333333	87,3333333	87,6666667
Témoin (0%)	84,6666667	85	86,6666667	87,3333333	88,3333333	89,3333333
Huile (2 %)	81,6666667	82,6666667	82,6666667	83,3333333	85,6666667	85,6666667



**Figure29:** Evolution de l'acidité °D des laits fermentés (type yaourt) additionnés de l'huile de pépins de raisin au cours de la période post-fermentation.

Au cours de la phase post-acidification l'évolution de l'acidité des laits fermentés (type yaourt ferme) est caractérisée par une augmentation remarquable de 84,66°D au premier jour à 89,33°D au sixième jour (Témoin 0%). Le stockage était à 4°C.

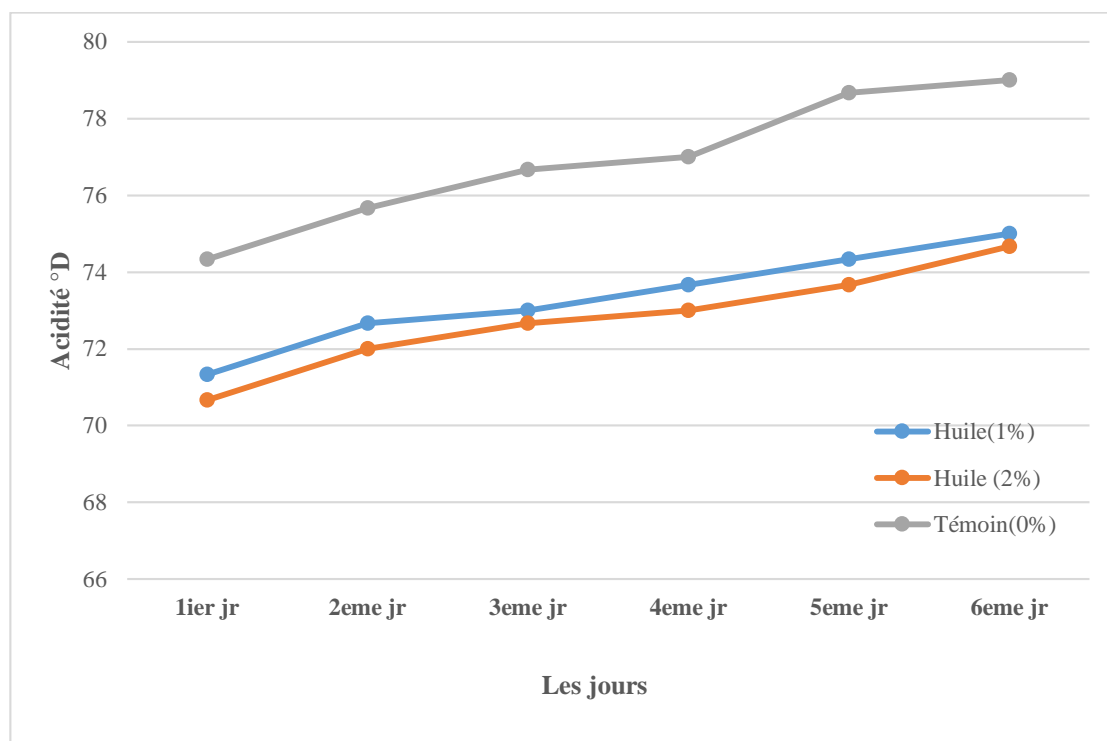
Egalement, ces valeurs s'avèrent Diminuer avec les doses d'huile de pépins de raisin incorporés lors de la preparation:

→ **(2%)**: les valeurs augmentent de 81,66°D au 1<sup>ier</sup> jour à 85,66 °D au 6<sup>ième</sup> jour.

→ **(1%)**: les valeurs augmentent de 83°D au 1<sup>ier</sup> jour à 87,66 °D au 6<sup>ième</sup> jour.

## ❖ Deuxième préparation de yaourt:

Les jours Echantillon	1ier jr	2eme jr	3eme jr	4eme jr	5eme jr	6eme jr
<b>Huile (1%)</b>	71,3333333	72,6666667	73	73,6666667	74,3333333	75
<b>Huile (2%)</b>	70,6666667	72	72,6666667	73	73,6666667	74,6666667
<b>Témoin (0%)</b>	74,3333333	75,6666667	76,6666667	77	78,6666667	79



**Figure30:** Evolution de l'acidité des laits fermentés (type yaourt) additionnés de l'huile de pépins de raisin au cours de la période post-fermentation.

Au cours de la phase post-acidification l'évolution de l'acidité des laits fermentés (type yaourt ferme) est caractérisée par une augmentation remarquable de 74,33°D au premier jour à 79°D au sixième jour (Témoin 0%). Le stockage était à 4°C.

Egalement, ces valeurs s'avèrent Diminuer avec les doses d'huile de pépins de raisin incorporés lors de la preparation:

→ **(2%):** les valeurs augmentent de 70,66°D au 1<sup>ier</sup> jour à 74,66 °D au 6<sup>ième</sup> jour.

→ **(1%):** les valeurs augmentent de 71,33°D au 1<sup>er</sup> jour à 75°D au 6<sup>ième</sup> jour.

On déduit que l'évolution de l'acidité est inversement proportionnelle avec le taux d'incorporation.



### Conclusion et perspectives :

Le sujet abordé dans ce mémoire s'inscrit dans une étude globale sur l'huile de pépins de raisin et son pouvoir antibactérien.

Il était indispensable pour poursuivre ce travail, d'effectuer une analyse physico-chimique et microbiologique de cette huile.

Nous avons réussi à optimiser le rendement en huile de pépins de raisin par extraction chimique (soxhlet) en fixant le temps d'extraction à 6 heures et en utilisant N-Hexane comme solvant.

L'analyse physico-chimique de l'huile de pépin de raisin a révélé grâce à l'indice de réfraction que l'huile est riche en acide gras insaturés ( $\omega$ -6). Les valeurs des caractéristiques physico-chimiques de l'huile de pépins de raisin sont intermédiaires par rapport à celles d'autres huiles végétales décrites.

Dans une deuxième partie, notre travail a été consacré à l'étude du pouvoir antimicrobien de l'huile de pépins de raisin. Peu de travaux sont rapportés sur l'activité antibactérienne des huiles végétales.

L'huile pure n'a pas eu d'activité sur les souches bactériennes à notre disposition appart la salmonelle (n'a pas donné de bons résultats zone d'inhibition 10 mm), cependant il pourrait en être autrement sur d'autres espèces bactériennes.

La consommation de yaourt dans notre pays marque son grand record cette dernière décennie, les principes de conservation sont divers mais à savoir à quel prix, les conservateurs synthétiques et autres additifs font polémique. L'huile de pépin de raisin est à notre disposition pour nous offrir un produit essentiel dans la régulation et la maintenance de l'acidité permettant une consommation bio et saine.

D'après notre étude, l'huile de pépin de raisin qui est incorporé à différentes doses respectivement 1% et 2% montre un effet bactériostatique sur les bactéries lactiques spécifique du yaourt (*streptococcus thermophilus* et *lactobacillus bulgaricus*).

Nous nous sommes fixés comme perspectives à ce travail:

- ◆ D'analyser l'huile de pépin de raisin par CPG/SM, puis d'affiner l'analyse sur l'insaponifiable car il pourrait renfermer de nombreuses molécules «intéressantes» ;
- ◆ De tester l'huile de raisin sur d'autres souches de bactéries, mais aussi tenter de l'émulsifier avec d'autres produits ;
- ◆ D'effectuer une étude toxicologique de l'huile de pépins de raisin pour pouvoir la valoriser comme huile végétale comestible ou thérapeutique ;
- ◆ De mener des études microbiologiques sur d'autres huiles fixes telles que l'huile de nigelle. Cette dernière semble donner de meilleurs résultats quant à son pouvoir antibactérien,

- ◆ Il est intéressant de faire des études comparatives sur d'autres cultivars en jouant sur les dates de récoltes, type de sol, méthodes d'extractions.
- ◆ Entreprendre une étude moléculaire sur l'influence de la variabilité génotypique sur la composition chimique de notre huile et d'approfondir les études sur le marc de raisin qui pourra servir d'une base juteuse, parfumée et sucrée pour l'industrie agroalimentaire.
- ◆ Même une analyse organoleptique mérite d'être conduite sur notre yaourt. Il serait aussi intéressant de valoriser d'autres produits du pépin de raisin notamment le tourteau.
- ◆ En parallèle, nous souhaiterions identifier de nouvelles molécules telles que des polyphénols provenant de différentes parties de la plante d'espèces étudiées grâce aux dosages par GC-SM et par HPLC-SM.
- ◆ Cette étude mérite d'être poussée par variété de raisin et par région.

### Références bibliographiques

#### A :

**Aurelie Furiga, Aline Lonvaud-Funel, Cecil Badet., 2008.** In vitro study of antioxydant capacity and antibacterial activity on oral anaerobes of a grape seed extract . Food Chemistry 113(2009) 1037-1040.

**Afnor (2009b)** Graines oléagineuses - Détermination de la teneur en huile (Méthode de référence). Dans : NF EN ISO 659

**Afnor (2010)** Graines oléagineuses : détermination de la teneur en eau et en matières volatiles. Dans : NF EN ISO 665

**Abi-ayad M. 2009.** Contribution à l'étude physico-chimique de l'huile essentielle du Pin d'Alep (Pinus halepensis) de la région de Tlemcen & de son activité antimicrobienne. Mémoire de magister ; Université Abou-Bakr Belkaïd, Tlemcen.

**Amrouche A., Chaoufi A., Mebarki K., Sanebi A., 2010.** Evaluation de l'activité antifongique de quelques huiles (huile de coloquinte-huile de nigelle-huile de lin) sur une souche d'Aspergillus flavus productrice d'aflatoxines. Mémoire pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en contrôle de qualité et analyses, Université de Béchar.

#### B :

**Bouamara Kenza & Haddad Souhila., 2016.** Evaluation des activités biologiques de quelques huiles végétales (mémoire master 2015/2016).

**Ben Idir Idir et Babour Boubeker., 2016.** Les caractérisitiques du figuier de barbarie et la valorisation des raquettes. Université mostaganem

#### C :

**Carla M. Peixotoa, Maria Inês Diasa, Maria José Alvesa, Ricardo C. Calhelhaa, Lillian Barrosa, Simão P. Pinhob, Isabel C.F.R. Ferreiraa., 2018.** Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. Food Chemistry 253 (2018) 132-138. Portugal.

**Cabanis, J. C., Cabanis, M. T., Cheynier, V., Teissedre, P. L. (1998)** Caractérisation de la matière première et des produits élaborés. Dans : Œnologie : fondements scientifiques et technologiques. Eds Flanzy, C., Lavoisier, Tec & Doc, Paris, pp 291-336

#### D :

**DRALI Manel et IKHLEF Lynda., 2017.** Étude physico-chimique de la pulpe et de l'huile extraite à partir des graines de figue de barbarie. Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme master specialit2 génie des industries alimentaire. Université M'hamed Bougara Boumerdes.

#### H :

**Hatem Ben Mohamed, Kurabachew Simon Duba, Luca Fiori, Hamada Abdelgawed, Imen Tlili, Taieb Tounekti, Ahlem Zrig., 2016.** Bioactive compound and antioxydant activities of different grape (Vitis vinifera L) seed oils extracted by supercritical CO2 and organic solvent. LWT - Food Science and Technology 74 (2016) 557-562. Tunisia

<http://www.aromatherapieveterinaire.com/aromatogramme/>

Paul Belaiche, traité de phytothérapie et d'aromathérapie, tome 1 « l'aromatogramme »

<http://www.binmeibio-fr.com/info/antimicrobial-activity-of-plant-oils-22474134.html>

Thèse Nantes 2006 du Dr H Masson : traitement des mammites en agriculture biologique, utilisation de l'aromathérapie.

<http://www.isae35.fr/fr> : Journées nationales GTV Nantes 2013 : aromatoigramme, mise en place d'une méthodologie sur des souches de mammites bovines.

<http://agriculture.gouv.fr/> : Le plan national de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire promeut des solutions alternatives aux antibiotiques.

<http://docnum.univ-lorraine.fr> : Thèse pour le titre de docteur en pharmacie : « Utilisation des huiles essentielles en infectiologie ORL », par F Da Silva.

<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Marche/raisin.htm>.

### J :

**Jonathan Delgado Adamez, Esther Gamero Samino, Esperanza Valdès Sanchez, David Gonzalez-Gomez., 2011.** In vitro estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grape seeds (*Vitis vinifera* L.). Instituto Tecnológico Agroalimentario (INTAEX). Ctra, San Vicente S/N, 06071 Badajoz, Spain.

### K :

**Khalil Farhadi, Forough Esmailzadeh, Mehdi Hatami, Mehrdad Forough, Rahim Molaie., 2015.** Determination of phenolic compounds content and antioxidant activity in skin, pulp, seed, cane and leaf of five native grape cultivars in West Azarbaijan province, Iran. PII : S0308-8146(15)30361-7 DOI : <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.083> Reference : FOCH 18562 To appear in : Food Chemistry.

### L :

**Luana Fernandes, Susana Casal, Rebeca Cruz, José Alberto Pereira, Elsa Ramalhosa., 2012.** Seed Oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. Food Research International 50 (2013) 161-166. Portugal

### M :

**MOSTEFA-KARA Ikrame née BOUBLENZA., 2011.** Contribution à l'étude de l'analyse de l'huile de *Citrullus colocynthis* (Coloquinte) et de son pouvoir antimicrobien. (MEMOIRE DE MAGISTER DE BIOLOGIE, Option : Substances Naturelles, Activité Biologique et Synthèse).

**Mohammedi Zohra., 2013.** Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie. Option : Substances naturelles, Activités Biologiques et Synthèses ; Thèse de Doctorat .Telemcen.

**Meghainai Halima et Hama Chahrazed. 2017.** Effets antimicrobiens de l'extrait à l'éthanol de *Thymus vulgaris* (thym) récolté dans la région de Sétif sur la qualité et la stabilité d'un lait fermenté alicament type yaourt ferme. Master en Agronomie (biotechnologie alimentaire) Université de Mostaganem.

### N :

**Natacha Rombaut, Raphaëlle Savoie, Brigitte Thomasset, Jérémie Castello, Elisabeth Van Hecke, Jean- Louis Lanoisellé., 2014.** Optimization of oil yield and oil total phenolic content during grape seed cold screw pressing. Université de Bordeaux, France.

**Natacha ROMBAUT., 2013.** Etude comparative de trois procédés d'extraction d'huile : aspects qualitatifs et quantitatifs : application aux graines de lin et aux pépins de raisin. Thèse présentée pour l'obtention du grade de Docteur de l'UTC.

### O :

**Ollé, M. (2002)** Analyse des corps gras. Techniques de l'ingénieur, dossier P3325, pp 15.

**Ollé M., 2002.** Analyse des corps gras. Bases documentaires: techniques d'analyses; Référence P3325; Ed.Techniques de l'ingénieur. <http://www.techniques-ingenieur.fr>

### P :

**Pascal CHATONNET Ph.D.** Intérêts Thérapeutiques des Molécules Extractibles du Raisin de *Vitis Vinifera*. Laboratoire EXCELL, 33700 MERIGNAC, France. [www.labexcell.com](http://www.labexcell.com)

**Pagès-Xatart-Parès X., 2008.** Technologie des corps gras (huiles et graisses végétales). Ed.Techniques de l'ingénieur,

### R :

**Rahmoun M. N., 2009.** Essai de tests biologiques (antibactériens/ antifongiques) de produits dérivés de la lawsonie. Mémoire de magister, Université Abou-bakr Belkaïd, Tlemcen

**Rey J.F.G.S., 2010.** Détermination des valeurs critiques pour l'antibiogramme vétérinaire par une approche de type Monte Carlo. Thèse (pour l'obtention du diplôme docteur vétérinaire). Université de Toulouse, France. p 16

### S :

**Stefanie Bail, Gerald Stuebiger, Sabine Krist, Heidrun Unterweger, Gerhard Buchbauer., 2007.** Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. 23 Nov 2007 institute for foodstuffs, AGES, 191, 1226, Vienna, Austria.

### T :

**TIAC - Risques Sanitaires des Aliments,Toxi-Infections Alimentaires Collectives (cours M. Boudroua.K).**

### V :

**VÉRONIQUE ZULIANI ET PASCAL GARRY., 2004.** Les germes pathogènes dans l'industrie agroalimentaire. revue "Salles propres" qui a publié cet article,pages 12-16.

**Vanier P., 2006.** Courge. Passeport santé. Net sur [http://passeportsante.net/fr/Nutrition/EncyclopedieAliment/Fiche.aspx?doc=courge\\_nu](http://passeportsante.net/fr/Nutrition/EncyclopedieAliment/Fiche.aspx?doc=courge_nu)

**W :**

**Wikipédia, 2010.** [www.Wikipedia.com](http://www.Wikipedia.com)

**Y :**

**Yves CADOT., 2010.** Influence de la date de vendange sur les composés phénoliques de la baie de raisin ; conséquences pour la typicité du vin. Spécialité : Biochimie, chimie et technologie des aliments. Montpellier Supagro.

**Z :**

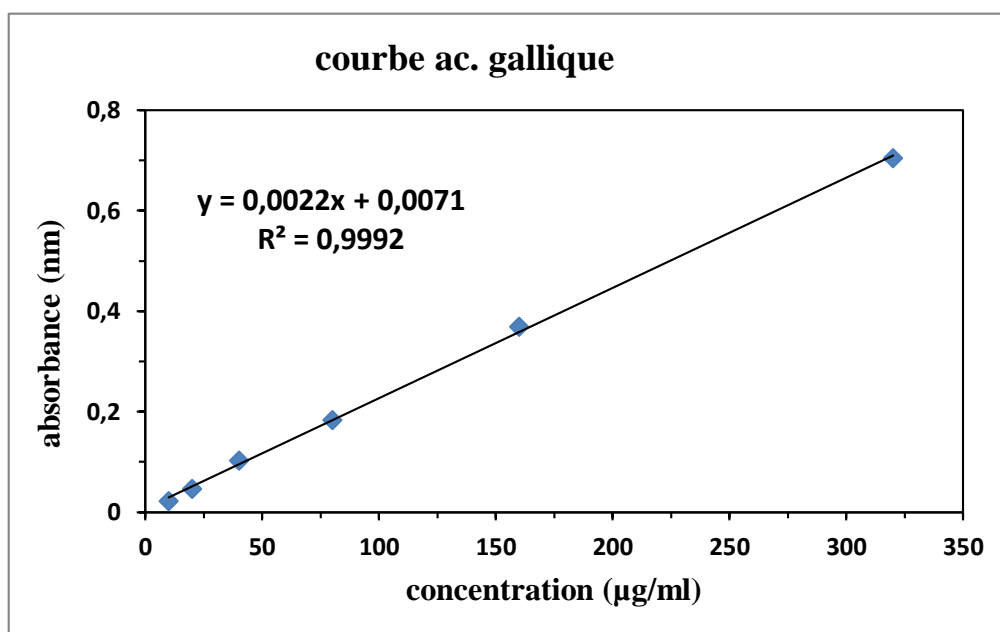
**ZEGHOUANE Hanane., 2014.** Essai de caractérisation phytochimique des extraits de quelques plantes médicinales du Sahara septentrional Est- Algérien. Mémoire MASTER ACADEMIQUE. Université KASDI MERBAH Ouargla.

**Annexe 1 :****La gamme d'étalon des phénols totaux :**

La concentration d'un composé phénolique, l'acide gallique, sera déterminée grâce à une gamme d'étalon, pour cela. À partir d'une solution mère d'acide gallique de 20mg /50 ml (méthanol/eau), on prélève. 10 $\mu$ l /20  $\mu$ l /40  $\mu$ l /80  $\mu$ l / 100 $\mu$ l/ 320  $\mu$ l. Ces volumes sont complétés à 2 ml de réactif de Folin dilué 1/10, le mélange est bien agité, et laissé 6 min réagir à l'abri de la lumière, ensuite on ajoute 1,6 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 7,5%. Incuber 30min à 25°C . Puis lire l'absorbance à 765 nm.

(Blanc= MeOH)

$\mu$ g/ml	10	20	40	80	160	320
Abs (nm)	0,022	0,046	0,102	0,183	0,369	0,704



**Figure:** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour les polyphénols totaux des grains de raisin.

**Annexe 2 :**

Les composés phénoliques dans les graines et la peau de raisin (K.Farhadi et al. 2016)

Phenolic compounds in seeds and skin of 8 cultivars of international dark grapes.

Species/cultivars	Color	Total phenolics (mg/ g)		Total flavonoids (mg/ g)		Total anthocyanin (mg/ g)		Ref
		Seeds	Skin	Seeds	Skin	Seeds	Skin	
Cabernet Sauvignon	Dark purple	-	2.19±0.24	-	9.19 ± 0.15	-	0.67 ± 0.04	Du et al.
Black Pearl	Black	18.34 ± 0.05	40.20 ± 0.97	9.81±0.59	23.19 ± 0.65	-	18.68 ± 0.08	Lu et al.
Purple grape	Purple	15.79 ± 0.48	27.56 ± 1.01	9.96±0.94	19.74 ± 0.77	-	7.04 ± 0.03	Lu et al.
Merlot	Dark purple	-	1.79 ± 0.13	-	3.96 ± 0.1	-	0.68 ± 0.03	Du et al.
Muscadine	purple	19.79 ± 4.93	3.35 ± 0.43	-	-	0.04 ± 0.02	1.32 ± 0.47	Akoh et al.
Tannat	Red	-	0.57±0.06	-	-	-	10.31 ± 1.41	Gonzalez-Neves et al.
Camenere	Red	17.72±1.2	1.82 ± 0.2	-	-	-	1.77±0.3	Obreque-Slier et al.
Pinot Noir	Red	16.51±0.98	6.60±0.05	0.56±0.13	11.18±2.50	-	3.85±0.05	Rockenbach et al.

**Annexe 3 :**

L'activité antioxydante de l'huile de pépins de raisin de différentes variétés (L. Fernandes et al. / Food Research International 50 (2013) 161–166)

Antioxidant activity of the ten grape-seed oils.

Varieties	ABTS ( $\mu\text{mol Trolox/ml oil}$ )	DPPH radical scavenging effect (%)
Tinto Cão	0.477 ± 0.001	65.39 ± 0.14
Aragonês	0.489 ± 0.000	59.41 ± 0.54
Touriga Francesa	0.486 ± 0.001	50.74 ± 0.52
Marufo	0.482 ± 0.000	67.83 ± 0.15
Touriga Nacional	0.391 ± 0.001	56.20 ± 0.52
Tinta Carvalha	0.480 ± 0.000	51.49 ± 0.09
Cornifesto	0.489 ± 0.000	69.89 ± 0.74
Trincadeira Preta	0.489 ± 0.000	38.68 ± 0.09
Periquita	0.483 ± 0.000	50.65 ± 0.17
Tinta Barroca	0.334 ± 0.000	53.38 ± 0.09

## Annexe 4 :

Le profil en acide gras de l'huile de pépins de raisin de différentes variétés (L. Fernandes et al. / Food Research International 50 (2013) 161–166)

Oil contents (% v/m dry basis) of grape seeds and fatty acid composition of grape-seed oils.

	Grapes varieties									
	Tinto cão	Aragonês	Touriga Francesa	Marufo	Touriga Nacional	Tinta Carvalha	Cornifesto	Trincadeira Preta	Periquita	Tinta Barroca
Oil content (% v/m dry basis)	12.06±0.36	10.78±0.05	12.40±0.01	3.95±0.02	11.12±0.88	8.49±0.36	7.79±0.42	9.89±0.92	7.24±0.58	6.41±0.65
C14:0	0.06a (0.05–0.09)	0.06a (0.05–0.06)	0.13b (0.09–0.18)	0.16b (0.14–0.18)	0.07a,c (0.06–0.08)	0.08c,d (0.08–0.10)	0.07a (0.06–0.08)	0.10b,d (0.09–0.10)	0.07a,c (0.05–0.09)	0.12b (0.10–0.14)
C16:0	7.00a (6.53–7.44)	7.28a,b (7.23–7.43)	7.49c,d (7.43–8.59)	7.01a,e (6.96–7.06)	6.99a (6.86–7.33)	6.71a (6.69–6.80)	6.71f (6.69–6.80)	7.34b,d (7.30–7.38)	6.17f (6.09–6.25)	8.50c (8.00–9.04)
C16:1	0.15a,b,c (0.14–0.15)	0.13b (0.11–0.14)	0.20d,e (0.20–0.22)	0.22e (0.21–0.24)	0.18d,f (0.17–0.20)	0.17a,f (0.14–0.19)	0.14a,b (0.09–0.17)	0.17f (0.14–0.22)	0.18c,f (0.16–0.19)	0.24e (0.20–0.30)
C17:0	0.07a (0.06–0.08)	0.07a (0.06–0.08)	0.09b,c (0.08–0.09)	0.14b (0.14–0.14)	0.08a,c,d (0.08–0.08)	0.07a (0.06–0.08)	0.07a,e (0.03–0.09)	0.08a,e (0.07–0.08)	0.08b,d (0.08–0.09)	0.10b (0.08–0.11)
C17:1	0.04a (0.04–0.04)	0.02a (0.00–0.004)	0.04a (0.04–0.06)	tr	0.04a (0.03–0.05)	0.03a (0.03–0.004)	0.03a (0.03–0.04)	0.03a (0.03–0.05)	0.01a (0.00–0.04)	0.04a (0.03–0.05)
C18:0	4.85a,b (4.16–5.88)	4.09c (3.95–4.19)	4.89b,d (4.81–4.96)	4.58a,c (4.48–4.68)	4.72a,d (4.68–4.74)	4.65a,c (4.62–4.69)	4.72a,d (4.60–5.01)	4.78a,b (4.70–4.85)	5.04b,e (5.00–5.08)	5.91e (5.13–6.74)
C18:1	16.1a (14.6–17.1)	14.8b,c (14.6–15.3)	20.8d (20.5–20.9)	13.7 (13.6–13.99)c	20.3d (20.1–20.4)	15.2a,b (14.9–15.49)	18.7e (18.3–18.7)	17.1f (16.0–17.3)	17.1f (17.0–17.2)	20.8d (19.8–22.0)
C18:1t	0.04a,b,c (0.04–0.05)	0.05a,c (0.00–0.15)	tr	0.16 (0.15–0.18)a,b	tr	tr	0.00c,d (0.00–0.09)	0.01c,e (0.00–0.02)	0.01d,c (0.00–0.02)	0.04a,c (0.00–0.10)
C18:2cc	70.8a (68.7–72.4)	72.3b (71.8–72.6)	65.3c,d (64.6–65.5)	73.1b (72.8–73.3)	66.6c (66.0–66.8)	71.9b (71.8–72.3)	69.4e (68.4–69.5)	69.7a,e (69.1–70.69)	70.2a,e (70.1–70.3)	63.0d (60.4–65.4)
C18:2t	0.12a (0.11–0.13)	0.13a (0.11–0.14)	0.06b,d (0.00–0.09)	tr	0.05b (0.04–0.05)	0.07b,e (0.07–0.07)	0.08b,c,e (0.05–0.10)	0.08a,d,e (0.07–0.11)	0.08a,c,d,e (0.07–0.3)	0.16a,c (0.08–0.25)
C18:3	0.47a,b (0.39–0.48)	0.51a (0.47–0.55)	0.45b,c (0.44–0.48)	0.43b,d,e (0.40–0.46)	0.46a,b (0.46–0.48)	0.47a,c,d (0.45–0.51)	0.42b,d,g (0.39–0.51)	0.36e,g,h (0.33–0.45)	0.49a (0.50–0.50)	0.43b,h (0.42–0.45)
C20:0	0.23a,b (0.21–0.25)	0.22a,b,c (0.21–0.25)	0.20d,e (0.16–0.23)	0.27f (0.27–0.28)	0.18d (0.18–0.19)	0.20c,d (0.18–0.249)	0.21a,b,c,e (0.21–0.24)	0.22a,c,e (0.20–0.22)	0.24b,f (0.22–0.26)	0.26f (0.25–0.32)
C20:1	0.17a,b,c (0.16–0.20)	0.19a (0.18–0.20)	0.18a,b (0.17–0.22)	0.11 (0.11–0.12)c	0.22d (0.20–0.24)	0.20e,d (0.20–0.24)	0.22d (0.21–0.24)	0.19a (0.18–0.20)	0.19a,e (0.18–0.20)	0.17b,c (0.16–0.17)
C20:2n6	0.05a (0.05–0.06)	0.05a,b,c (0.04–0.06)	tr	tr	0.05a,b (0.04–0.06)	0.04a,c (0.04–0.06)	0.04b,c,f,g,h (0.04–0.05)	0.05a,b,c,d (0.04–0.07)	0.04b,c,e,f,g,h (0.03–0.05)	0.05a,h (0.04–0.07)5
C22:0	0.04a,b,c (0.00–0.12)	0.07b,d (0.05–0.12)	0.06a,b (0.06–0.07)	tr	0.06a,b,f (0.06–0.07)	0.05a,d,c (0.05–0.05)	0.09f (0.06–0.09)	0.05a,b,f,g (0.05–0.08)	0.04c,g (0.03–0.05)	0.05b,d,f,g (0.05–0.08)
Total SFA	12.25	11.73	12.86	12.16	12.10	11.76	11.87	12.57	11.64	14.94
Total MUFA	16.50	15.19	21.22	14.19	20.74	15.60	19.09	17.50	17.49	21.29
Total PUFA	71.44	72.99	65.81	73.53	67.16	72.48	69.94	70.19	70.81	63.64
PUFA/SFA	5.83	6.22	5.12	6.05	5.55	6.16	5.89	5.58	6.08	4.26

nd – not detected; tr – trace amount.

Values with different bold letters within each column are significantly different ( $p < 0.05$ ).

## Annexe 5 :

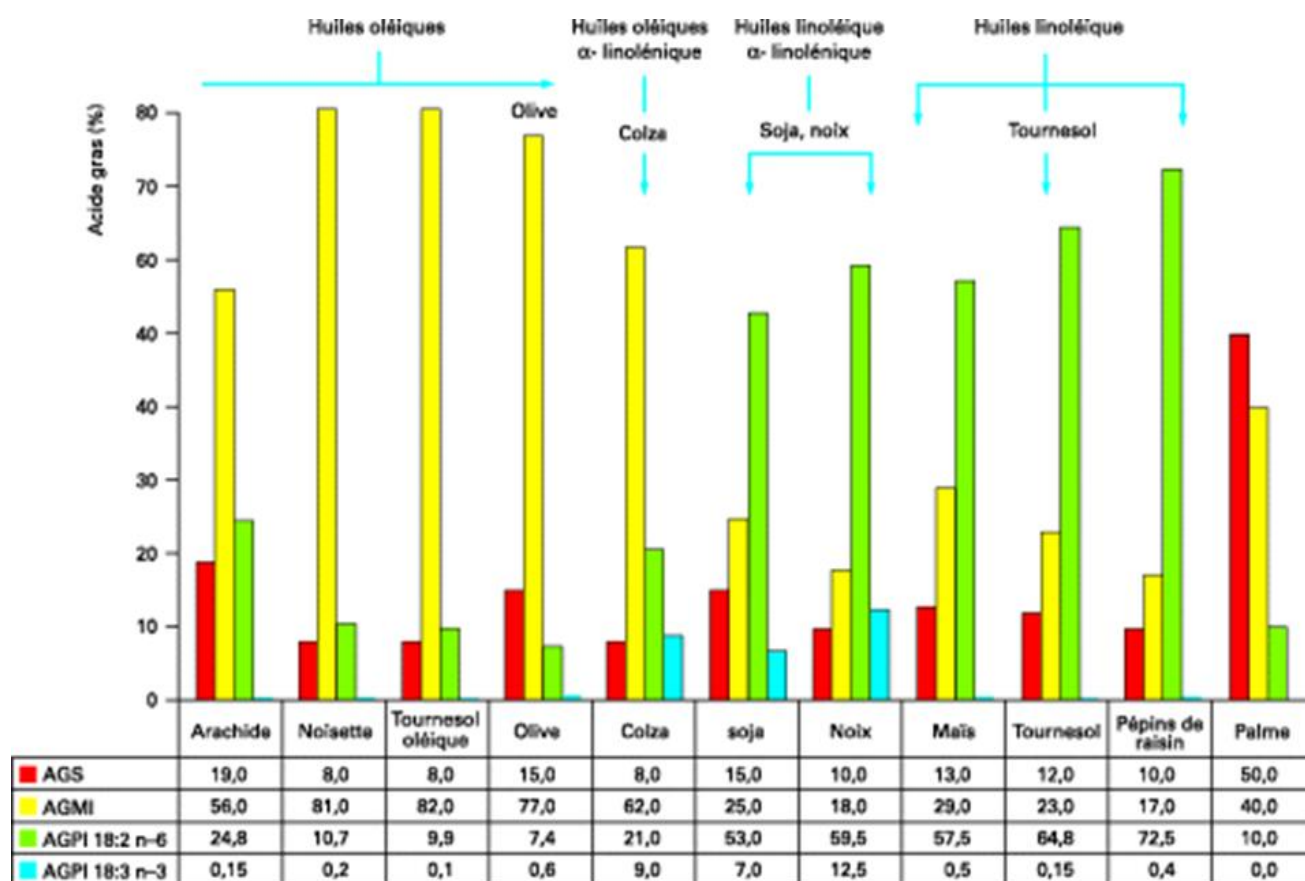


Figure : Classement des principales huiles végétales par catégorie d'acides gras (saturés, monoinsaturés et polyinsaturés)

**Annexe 6 :**

Les polyphénols totaux et la capacité antioxydante de l'huile de pépins de raisin de différentes variétés (S. Bail et al./Food Chemistry 108 (2008) 1122–1132)

**Total phenol content and antioxidant capacity of grape oil varieties**

	TPC <sup>a</sup> (µg/g) ± SD <sup>b</sup>	TEAC <sup>c</sup> (µg/g) ± SD <sup>b</sup>
Grape seed oil A	70 ± 0.01	0.14 ± 0.0
Grape seed oil B	68 ± 0.03	0.52 ± 0.01
Grape seed oil C	63.5 ± 0.005	0.09 ± 0.01
Grape seed oil D	59 ± 0.02	0.90 ± 0.07
Grape seed oil E	105.5 ± 0.06	0.43 ± 0.03
Grape seed oil F	108 ± 0.002	0.87 ± 0.00
Grape seed oil G	115.5 ± 0.005	1.16 ± 0.02
Grape seed oil H	103.5 ± 0.0 6	0.72 ± 0.21
Grape seed oil I	69.5 ± 0.06	0.73 ± 0.32

<sup>a</sup> Total phenol content analyzed as gallic acid equivalent (GAE) µg/g of oil, values are the average of triplicates.

<sup>b</sup> SD Standard deviation.

<sup>c</sup> Antioxidant capacity analyzed as TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) [µg/g] of oil, values are the average of triplicates.

**Annexe 7:**

Dosage des pigments dans l'huile de pépins de raisin (H. Ben Mohamed et al. / LWT - Food Science and Technology 74 (2016) 557e562)

**Table 3**

Chlorophylls and carotenoids content (mg/kg oil) in grape seed oils obtained by supercritical CO<sub>2</sub> (SC-CO<sub>2</sub>) and Soxhlet (n-hexane) from six grape (*Vitis Vinifera* L.) cultivars. Each value represents the mean ± SD of three replicates.

	Chlorophylls content (mg/kg)		Carotenoids content (mg/kg)	
	SC-CO <sub>2</sub> extracted oil	Soxhlet extracted oil	SC-CO <sub>2</sub> extracted oil	Soxhlet extracted oil
Pinot Noir (PN)	2.28 ± 0.05b,A <sup>*</sup>	2.4 ± 0.2b,A	3.9 ± 0.2b,A	3.5 ± 0.1b,B
Muscat (MU)	1.68 ± 0.04c,A	1.8 ± 0.1c,A	3.4 ± 0.1c,A	2.8 ± 0.2c,B
Muller Thurgau (MT)	2.2 ± 0.2b,A	2.3 ± 0.1b,A	3.5 ± 0.3bc,A	2.9 ± 0.1c,B
Nebbiolo (NE)	2.4 ± 0.2b,A	2.3 ± 0.1b,A	4.7 ± 0.2a,A	4.0 ± 0.1a,B
Chardonnay (CH)	1.0 ± 0.1d,A	1.1 ± 0.2d,A	2.7 ± 0.2d,A	2.6 ± 0.3c,A
Barbera (BA)	3.8 ± 0.3a,A	3.2 ± 0.2a,B	4.8 ± 0.3a,A	4.0 ± 0.2a,B

<sup>\*</sup>Analysis of variance ANOVA and student's T-test were performed considering cultivar and extraction process as factors, respectively. Different tiny letters (a-d) indicate significant differences between cultivars for each extraction process according to Duncan's multiple range test ( $P < 0.05$ ). Different capital letters (A-B) indicate significant differences among the extraction processes for each cultivar according to Student's t-test ( $P < 0.05$ ).