

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**  
**UNIVERSITE AKLI MOUHAND OULHADJ- BOUIRA**  
**FACULTE DE SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE**  
**DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES**



**Réf : ...../ UAMOB/F.SNV.ST/DEP.AGR/2018**

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**  
**EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER**

**Domaine : SNV      Filière : Sciences Agronomiques**

**Spécialité : Agroalimentaire et Contrôle de Qualité**

**Présenté par :**

***MESSAOUR Halima***

***Thème***

**L'étude de l'effet de l'incorporation de l'huile essentielle  
d'orange dans le fromage fondu de la laiterie et  
fromagerie Boudouaou**

**Soutenu publiquement le : 22/09/2018**

**Devant le jury composé de :**

*Mme. FERHOUM.F*

*MAA*

*Univ de Bouira*

*Promotrice*

*Mme.BOURFIS.N*

*MAA*

*Univ de Bouira*

*Présidente*

*Mme.CHEKROUNE.M*

*MCB*

*Univ de Bouira*

*Examinatrice*

**Année Universitaire : 2017/2018**

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail ...*

*A mon père*

*Mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller toujours à l'avant et ne jamais baisser les bras et pour son enseignement continu.*

*A ma mère*

*Pour son affection, sa patience, sa compréhension, sa disponibilité, son écoute permanente et son soutien.*

*Mes chers parents que Dieu vous garde.*

*A mes chers frères et mes adorables sœurs qu'aucun mot ne pourra décrire leur dévouement et leur soutien pour vous exprimer toute mon affection et ma tendresse.*

*A mes collègues, à ma famille et à ceux qui me sont chers.*

*A Mes chers amis que l'amitié sincère nous a liées, en témoignant les bons moments passés ensemble.*

*A Toutes les personnes qui ont cru en moi, qui m'encouragent et qui me donnent toujours l'envie d'aller en avant.*

***Halima***

## **Remerciements**

*Je tiens, tout d'abord, à remercier Dieu, **ALLAH**, le tout puissant et miséricordieux, pour m'avoir donné le courage, la force ainsi que la capacité de pouvoir mener jusqu'au bout de ce modeste travail.*

*J'adresse mes profondes reconnaissances et mes chaleureux remerciements à ma promotrice **Mme FERHOUM**, pour les connaissances qu'elle n'a cessé de me prodiguer, de la confiance qu'elle m'a témoignée, pour m'avoir guidé et orienté tout au long de mon projet et surtout pour son aimable disponibilité.*

*Je voudrais également remercier les membres de mon jury : **Mme. CHEKROUNE** et **Mme. BOURFIS**, pour l'honneur qu'elles m'ont fait en portant leur attention sur ce travail.*

*Mes remerciements s'adressent à tout le personnel de l'entreprise de la laiterie et **fromagerie Boudouaou** à Boumerdès, ainsi aux ingénieurs de département science alimentaire de **l'Ecole Nationale Supérieur d'Agronomie** à El Harrach et à **laboratoire hygiénique de l'hôpital château de Bouira**.*

*Je remercie aussi **la technicienne de laboratoire 09** d'agronomie pour leur disponibilité et sa patience de recherche, pour son aide durant ma période d'expériences au laboratoire.*

*Enfin, je remercie vivement toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin afin que je puisse accomplir mon travail en toute quiétude.*

## Liste d'abréviation

<b>AFNOR</b>	: Association Française de Normalisation
<b>CE<sub>50</sub></b>	: Concentration Efficace à 50%
<b>CSR</b>	: Clostridium Sulfito-Réducteurs
<b>DO</b>	: Densité Optique
<b>DPPH</b>	: Diphenulpicrylhydrazine
<b>EST</b>	: Extrait Sec Total
<b>CPG/MS</b>	: Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectroscopie de Masse
<b>HE</b>	: Huile Essentielle.
<b>Ia</b>	: Indice d'acide
<b>Ie</b>	: Indice d'ester
<b>Ii</b>	: Indice d'iode
<b>Is</b>	: Indice de Saponification
<b>ISO</b>	: International Standard Organisation
<b>JORA</b>	: Journal Officiel Algérien
<b>MG</b>	: Matière Grasse
<b>OGA</b>	: Oxytétracycline Glucose Agar
<b>PCA</b>	: Plate Count Agar
<b>pH</b>	: Potentiel d'Hydrogène
<b>RHE</b>	: Rendement de l'Huile Essentielle
<b>UFC</b>	: Unité Formant une Colonie

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Roues de fromage à pâte dure (Ecolab, 2018).....	<b>03</b>
<b>Figure 02</b> : Etapes de fabrication de fromage.....	<b>04</b>
<b>Figure 03</b> : oranger, <i>citrus sinensis</i> sur tige de 50 (Eden, 2013).....	<b>13</b>
<b>Figure 04</b> : L'extraction par pression à froid ou expression (Anonyme, 2014).....	<b>16</b>
<b>Figure 05</b> : Hydro distillation ou distillation simple (Fragrance, 2011).....	<b>17</b>
<b>Figure 06</b> : Extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur d'eau (Anonyme, 2014).....	<b>18</b>
<b>Figure 07</b> : Poches sécrétrices des huiles essentielles des <i>Citrus</i> dans feuilles.....	<b>20</b>
<b>Figure 8</b> : Organigramme de la méthodologie de l'étude.....	<b>21</b>
<b>Figure 9</b> : Structure de DPPH et mécanisme de sa réduction par un antioxydant... ..	<b>31</b>
<b>Figure 10</b> : cinétique d'extraction de l'huile essentielle d'orange.....	<b>44</b>
<b>Figure 11</b> : chromatogramme de l'huile essentielle d'orange.....	<b>48</b>
<b>Figure 12</b> : pouvoir anti-radicalaire de l'huile essentielle d'orange.....	<b>50</b>
<b>Figure 13</b> : la courbe d'étalonnage des polyphénols.....	<b>52</b>
<b>Figure 14</b> : la courbe d'étalonnage des flavonoïdes.....	<b>53</b>
<b>Figure 15</b> : Préparation des échantillons de l'huile essentielle d'orange pour l'analyse microbiologique (A) dénombrement et recherche des levures et moisissures dans H.E d'orange/ (B) Dénombrement de FTAM.....	<b>53</b>
<b>Figure 16</b> : les Quatre échantillons de fromage fondu après Cinq jours de leur préparation.....	<b>59</b>
<b>Figure 17</b> : les quatre échantillons de fromages fondus après 10 jours de leurs préparations.....	<b>60</b>
<b>Figure 18</b> : le classement des échantillons par rang selon les dégustateurs.....	<b>64</b>
<b>Figure 19</b> : les résultats de l'appréciation des produits selon la texture.....	<b>65</b>
<b>Figure 20</b> : les résultats de l'odeur et l'arôme de nos échantillons.....	<b>66</b>
<b>Figure 21</b> : les résultats de gout de nos échantillons.....	<b>67</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Classification du fromage selon le codex alimentarius.....	05
<b>Tableau 2 :</b> Concentrations des solutions d'HE testées .....	34
<b>Tableau 3 :</b> Les caractères organoleptiques de l'huile essentielle de l'orange.....	46
<b>Tableau 4 :</b> Propriétés physiques de l'huile essentielle de l'orange .....	46
<b>Tableau 5 :</b> Paramètres chimiques de l'huile essentielle d'orange.....	46
<b>Tableau 6 :</b> les principaux composés de l'huile essentielle d'orange.....	49
<b>Tableau 7 :</b> la teneur de l'HE d'orange en composés antioxydants.....	51
<b>Tableau 8 :</b> les différentes concentrations de l'acide gallique.....	51
<b>Tableau 9 :</b> Préparation des dilutions de la quercétrine pour la réalisation d'une courbe standard des flavonoïdes.....	52
<b>Tableau 10:</b> caractéristiques microbiologiques de l'H.E d'orange .....	54
<b>Tableau 11:</b> Les principales caractéristiques physicochimiques du produit fini étudié...	56
<b>Tableau 12:</b> résultats d'analyse microbiologiques de produit fini .....	57
<b>Tableau 13 :</b> Résultats du test de comparaison par paire.....	62
<b>Tableau 14:</b> Résultats du test de classement par rang .....	63
<b>Tableau 15 :</b> les résultats de test hédonique .....	65
<b>Tableau 16 :</b> les résultats de l'appréciation de l'odeur.....	66
<b>Tableau 17:</b> les résultats de l'appréciation de gout.....	67

# Table des matières

<b>Introduction .....</b>	<b>01</b>
<b>PREMIERE PARTIE : Synthèse bibliographique</b>	
CHAPITRE I : le fromage .....	03
I.1. Définition du fromage .....	03
I.2. Historique et origine des fromages .....	03
I.3. Méthode générale de fabrication du fromage.....	04
I.4. Classification des fromages .....	05
I.5. Le fromage fondu .....	06
I.5.1. Définition de fromage fondu.....	06
I.5.2. Différents types de fromage fondu .....	06
• Fromage fondu de type bloc.....	06
• Fromage fondu type coupe.....	06
• Fromage fondu tartinable .....	06
• Fromage fondu toastable (pour fonte).....	07
• Fromage fondu thermostable .....	07
I.6. Composition et valeur nutritive .....	07
I.6.1. Composition .....	07
I.6.1.1. Eau.....	07
I.6.1.2. Protéines .....	07
I.6.1.3. Glucides.....	08
I.6.1.4. Lipides .....	08

I.6.1.5. Vitamines .....	08
I.6.1.6. Composition minérale .....	08
I.7. Valeur nutritive de fromage fondu stérile .....	09
I.8. Procédé de fabrication de fromage fondu.....	09
• Sélection de matière première et contrôle de qualité .....	09
• Ecroutage, découpage et broyage des fromages .....	09
• Préparation de la formule.....	09
• Fonte proprement dite.....	10
• Crémage .....	10
• Homogénéisation .....	10
• Conditionnement.....	10
Refroidissement et stockage.....	11
Conservation.....	11
II. Additifs alimentaires.....	11
II.1. Sels de fonte .....	12
II.2. Colorant .....	12
II.3. Eau .....	12
CHAPITRE II. Généralités sur les huiles essentielles .....	13
II .1. Les Oranges ( <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck).....	13
II.1.1. L'oranger et sa culture .....	13
II.1.2. Composition.....	14
II.1.3. Les Variétés.....	14
II.1.4. Utilisation.....	14



II.2. Généralités sur les huiles essentielles .....	15
II.2.1. Définition.....	15
II.2.2. Extraction des huiles essentielles .....	15
a. Pression à froid .....	15
b. Hydrodistillation.....	16
c. Entraînement à la vapeur d'eau .....	17
d. Autres techniques .....	17
II.3. Méthodes d'identification des huiles essentielles .....	18
II.3.1. La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) .....	19
II.3.2. Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG/SM) .....	19
II.4. Activités biologiques des huiles essentielles .....	19
II.5. Localisation et lieu de biosynthèse de l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> .....	19
II.6. Domaines d'application des huiles essentielles .....	20

## **DEUXIEME PARTIE : Matériel et Méthodes**

1. Extraction de l'huile essentielle .....	22
1.1. Matériel végétal.....	22
1.2. Extraction de l'huile essentielle .....	22
1.3. Suivi de la cinétique d'extraction.....	23
1.4. Calcul du rendement d'extraction .....	23
2. Détermination des indices physico-chimiques .....	24
2.1. Détermination des indices physiques .....	24
2.1.1. Caractéristiques organoleptiques .....	24
2.1.2. Détermination de taux d'humidité AFNOR 1982 .....	24
2.1.3. La densité relative (NF ISO 6883) .....	24

2.1.4. Indice de réfraction (ISO 6320).....	25
2.1.5. Miscibilité à l'éthanol.....	25
2.2. Détermination des indices chimiques.....	26
2.2.1. Indice d'acide (NF EN ISO 660).....	26
2.2.2. Indice d'ester.....	27
2.2.3. Indice de saponification (NF ISO 3657).....	27
2.2.4. Indice d'iode (NF ISO 3961).....	28
2.2.5. Indice de peroxyde (NF T 60-220 et ISO 3960).....	29
3. Analyse chromatographique.....	30
4. Evaluation des activités biologiques de l'huile essentielle de <i>Citrus sinensis</i> .....	31
4.1. Evaluation de l'activité antioxydante.....	31
4.1.1 Test du DPPH.....	31
4.1.2. Quantification des poly phénols totaux.....	32
4.1.3. Dosage des flavonoïdes.....	33
4.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	34
4.2.1. Recherche et dénombrement des levures et moisissures dans l'huile essentielle d'orange (NF V 08-059).....	34
4.2.2. Recherche et dénombrement de la flore mésophile aérobie totale.....	35
5. Incorporation de l'huile essentielle dans le fromage fondu.....	36
5.1. Fabrication de fromage fondu incorporé de l'huile essentielle d'orange.....	36
5.2. Détermination de l'effet de l'incorporation de l'huile essentiel.....	36
5.2.1. Analyses physicochimiques.....	36
5.2.1.1. Mesure de pH : (AFNOR1980).....	36
5.2.1.2. Détermination de la teneur en matière grasse.....	37
5.2.1.3. Détermination de la matière sèche totale EST.....	37

5.2.2. Les analyses microbiologiques.....	37
5.2.2.1. Préparations des solutions mères et des dilutions décimales.....	37
5.2.2.2. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux.....	38
5.2.2.3. Recherche et dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	39
5.2.2.4. Recherche et dénombrement des clostridium sulfito-réducteur (CSR).....	39
5.2.2.5. Recherche des salmonelles.....	40
6. Les analyses sensorielles.....	41
6.1. Panel.....	41
6.2. Test de comparaison par paire.....	42
6.3. Test de classement par rang.....	42
6.4. Test hédonique.....	43
 <b>Troisième Partie : Résultats et discussion</b>	
1. Extraction de l'huile essentielle de l'orange.....	44
1.1. Caractéristiques du fruit d'orange utilisé.....	44
1.2. Cinétique d'extraction.....	44
1.3. Le rendement en huile essentielle de l'orange.....	45
2- Propriétés physico-chimiques.....	46
3- L'analyse chromatographique.....	48
4- Les activités antioxydants de l'huile essentielle.....	50

5. Résultats de l'analyse microbiologique de l'huile essentielle d'orange .....	53
6. Elaboration et analyses de fromage fondu incorporés par H.E d'orange.....	55
6.1. Choix des doses d'incorporation en huile essentielle .....	55
6.2. Les analyses physicochimiques .....	56
6.3. Caractéristiques microbiologiques.....	57
6.3.1. Les coliformes totaux et fécaux .....	57
6.3.2. Les <i>Staphylococcus aureus</i> .....	57
6.3.3. Les <i>Salmonella</i> .....	58
6.3.4. Les <i>Clostridium sulfito-reducteurs</i> .....	58
6.3.5. Suivi de l'évolution de la qualité microbiologique de fromage élaboré en fonction de temps.....	59
6.4. Les analyses sensorielles .....	61
6.4.1. Test de comparaison par paire .....	61
6.4.2. Test de classement par rang .....	62
6.4.3. Test hédonique.....	64
<b>Conclusion.....</b>	<b>68</b>

Références bibliographiques

## Introduction

Le fromage est un produit alimentaire qui renferme, en plus de sa teneur en eau, plusieurs autres nutriments tels que les protéines, les glucides, les vitamines liposolubles et surtout la matière grasse, ce qui le rend sujette à différents types d'altérations microbienne et physicochimiques. (**Jeantet et al. 2006 ; St-Gelait et al. 2002**).

Une altération de la qualité hygiénique de fromage met en cause la santé du consommateur, cette altération est généralement invisible, elle est due à un développement de microorganismes pathogènes responsables d'intoxications alimentaires de gravités diverses. Une autre altération de la qualité marchande du fromage modifie ses caractéristiques organoleptiques (rancissement, altération du goût), cette altération bien que non dangereuse pour le consommateur, rend ce produit non commercialisable (**Bouix et Leveau, 1984**).

L'oxydation de la matière grasse est probablement la transformation chimique causant le problème majeur en technologie laitière surtout dans le fromage en raison de sa teneur élevée en matière grasse (**Collomb et Spahni, 1996**).

La conséquence la plus perceptible de celle-ci est l'apparition d'odeurs désagréables qui conduisent souvent au rejet du produit par le consommateur (**Prior, 2003**).

L'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour rehausser le goût et aromatiser les aliments (**Aprotosoie et al., 2010**).

D'autre part, les huiles essentielles possèdent des profils de composition chimique différents permettant de les utiliser comme agents naturels de conservation des aliments (**Holley et al., 2005**).

Plusieurs études ont été menées sur les activités biologiques des huiles essentielles de *Citrus sinensis*, telles que l'activité antioxydante (**Himed, 2011 et Hellal 2011**) et l'activité antimicrobienne (**Hammer et al., 1999 ; Caccioni et al., 1998 ; Moreira et al., 2005**).

Ces dernières sont avérées un moyen très prometteur pour pallier les risques d'altérations causés par les microorganismes ou par l'oxydation des lipides.

C'est dans cette optique que s'articule la présente étude, dont les principaux objectifs visent la possibilité d'utilisation de l'huile essentielle comme agent naturel conservateur et aromatique dans le fromage.

Notre travail de recherche est divisé en trois parties, la première partie est consacrée à une synthèse bibliographique sur le fromage et l'huile essentiel d'orange, dans la deuxième partie, nous avons adopté une démarche expérimentale qui porte sur la description des matériels et méthodes utilisés, et la troisième partie a été consacré à une analyse détaillée des résultats et leurs discussion suivis d'une conclusion générale et des perspectives.

## Chapitre I : Généralités sur le fromage

### I.1. Définition du fromage

Le fromage est le produit obtenu par coagulation du lait suivie d'un égouttage du coagulum dont les qualités nutritionnelles et organoleptiques sont appréciées par l'homme dans tout le globe. La définition «< fromage >> est réservée au produit fermenté ou non, affiné ou non, obtenu à partir des matières d'origines exclusivement laitières (lait, lait partiellement ou totalement écrémé, babeurre) utilisées seules ou en mélange et coagulées en tout ou en partie avant égouttage. (Jeantet et al., 2006)



Figure 01 : Roues de fromage à pâte dure (Ecolab, 2018)

### I.2. Historique et origine des fromages :

D'après Fox et Mc Sweeney (2004) la découverte du fromage fut probablement le fait du hasard, on n'en connaît pas l'origine précise, mais on sait grâce à des découvertes archéologiques qu'il se fabrique du fromage depuis les origines de l'élevage, il y a environ huit mille ans, dans le Croissant Fertile.

L'homme s'aperçut que le lait qu'il entreposait coagulait et, qu'une fois séparé de son sérum, le coagulum devenait une masse compacte qui pouvait sécher, et donc se conserver et être transportée.

L'acidification spontanée à l'origine de la coagulation entraînant du fait de sa lenteur une remontée de la crème à la surface, les laits fermentés, le petit lait aigre, et le beurre furent sans doute les premiers produits laitiers.

Les laits de brebis et de chèvre furent apparemment les premiers laits transformés, les ovins et les caprins ayant été les premiers animaux domestiques.

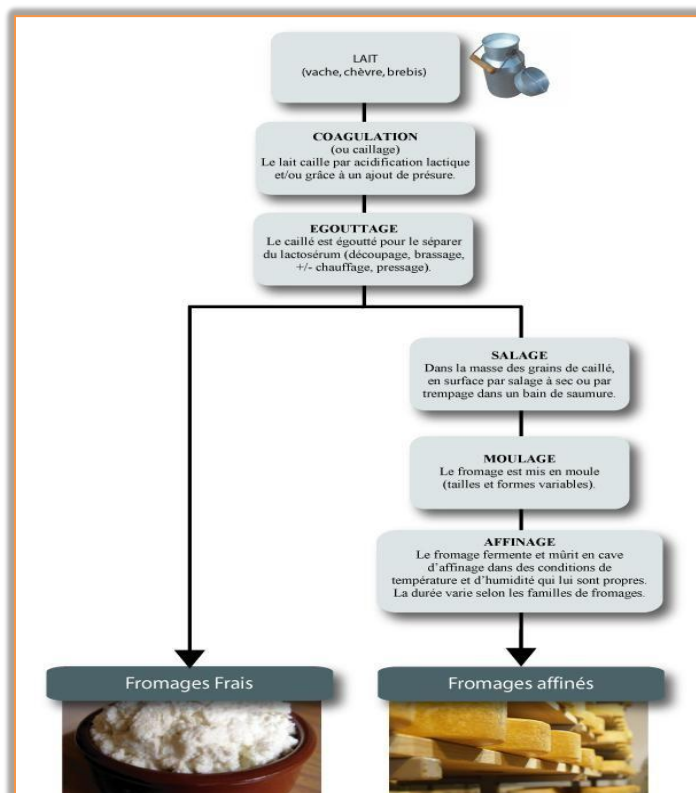
### I.3. Méthode générale de fabrication du fromage :

La transformation du lait en fromage comporte en générale quatre étapes (**Brule et al., 1997**) :

- La coagulation : modification physico- chimique entraînant la formation d'un gel sous l'action d'acide lactique et/ou enzymes ;
- L'égouttage : séparation d'une partie de lactosérum conduit à l'obtention du caillé ;
- Le salage : incorporation du sel ;
- L'affinage : transformation biochimique de la caille sous l'action des enzymes.

Ces dernières selon **Brule et al., (1997)**, peuvent être précédées par une opération de standardisation du lait, qui comprend l'ajustement du pH d'emprésurage pour faciliter la coagulation du lait, l'ajout de minéraux, la réduction de la teneur en lactose, l'ajustement de la teneur en matière grasse et ou en protéines (**Vignola, 2002**).

Les laits n'ont pas la même aptitude à la transformation fromagères, ils présentent un certain nombre de caractéristiques différentes qui conditionnent leur aptitude à la déstabilisation, nécessaire pour passer de l'état liquide a l'état solide ainsi que les propriétés des coagulums (**JEANTET et al., 2006**).



**Figure 02** : Etapes de fabrication de fromage



#### I.4. Classification des fromages :

La classification d'un fromage, tel que défini par les normes du codex alimentarius

**CODEX STAN A-6-1978** peut être accompagnée par des formules descriptives appropriées :

- Selon la fermeté (Formule I) qui appartient à l'intervalle de 69 à 51 % d'où la pâte molle évolue jusqu'à la pâte extra dure, cette classification est portée selon la teneur en eau dans le fromage dégraisse (TEFD).
- La deuxième classification (Formule II) est classée selon la teneur de la matière grasse par rapport à l'extrait sec total.
- La troisième classification (Formule III) les fromages sont classés en trois catégories différentes selon le type d'affinage du fromage, ces classifications sont mentionnées dans le Tableau 1 :

**Tableau 1** : Classification du fromage selon le codex alimentarius (**selon la norme CODEX STAN A-6-1978**)

Formule I		Formule II		Formule III
TEFD%	Le présent élément de la dénomination sera	MGES%	Le second élément de la dénomination sera	Dénomination d'après les principales caractéristiques d'affinage
< 51	Pâte extra dure	> 60	Extras gras	1. Affiné :
49-56	Pâte dure	45-60	Tous gras	a- principalement en surface
54-63	Pâte demi dure	25-45	Migras	b- principalement dans La masse.
61-69	Pâte demi molle	10-25	Quart gras	
> 67	Pâte molle	< 10	Maigre	2. affiné aux moisissures a- Principalement en surface. b- Principalement dans la masse. 3. Frais

TEFD : Pourcentage de la teneur en eau dans le fromage dégraisse ;

TEFD = Poids de l'eau du fromage x100/ (poids total du fromage - matière grasse du fromage) ;

MGES : Pourcentage de la matière grasse dans l'extrait sec ;

MGES = La teneur en matière grasse du fromage x100/ (poids total du fromage- eau dans le fromage) ;

Le fromage est donc classé selon trois critères successifs : sa teneur en eau dans la fraction dégraissée, sa teneur en matières grasses dans l'extrait sec et son type d'affinage.

(Tableau dans Annexe 01)

## **I. 5. Le fromage fondu**

### **I.5.1. Définition de fromage fondu :**

On appelle fromage fondu et fromage fondu pour tartiner, les produits obtenus par la fonte d'un fromage ou d'un mélange de fromage sous l'action de chaleur et d'agents émulsifiants avec ou sans adjonction de constituants laitiers ;**NA5936., 1993**

### **I.5.2. Différentes types de fromage fondu :**

D'après **Boutennier(2002)**, ces produits issus de fonte de fromages peuvent être regroupés en Cinq familles :

#### **I.5.2.1. Fromage fondu de type bloc :**

Le traitement thermique subi est modéré de manière à conserver au produit fini une élasticité marquée. Pour assurer sa stabilité, sa teneur en matière sèche est élevée et il est fondu partiellement ou totalement à partir de citrate de sodium.

#### **I.5.2.2. Fromage fondu type coupe :**

Moins ferme que le bloc, il n'est pas pour autant tartinable. Il contient trois à quatre points de moins de matière sèche que le précédent, ce qui le rend plus agréable à la dégustation. L'élasticité, parfois recherché, n'est pas toujours souhaitable en raison de la formation de fils qui rendent le conditionnement délicat sur les machines classiques

#### **I.5.2.3. Fromage fondu tartinable :**

C'est le processus de crémage qui permet en partie de régler la consistance du produit fini et de lui conférer une certaine tartinabilité. Ces produits peuvent être aromatisés et conditionnés en emballage souple (portions) ou rigides (pots, banquettes, tubes).

**I.5.2.4. fromage fondu toastable (pour refonte) :**

Originnaire d'Amérique de nord, il se présente généralement sous forme de tranches adaptés a une utilisation dans les cheeseburgers, les croque- monsieur ..... Ce produit doit refondre rapidement sans carbonisation superficielle, comme une tranche d'emmental par exemple, ce qui exige une préservation importante de la structure protéique des matières premières.

**I.5.2.5. Fromage fondu thermostable :**

Issu d'une demande extrême- oriental, à l'inverse du précédent, c'est un fromage fondu qui ne doit pas fondre lorsqu'on le soumet à une nouvelle source de chaleur. Il subit un crémage très poussé et les blocs obtenus sont découpés au japon puis incorporés dans des plats cuisinés à base de légumes ou du poisson. Ces préparations peuvent être appertisées et, à des températures élevées, les cubes de fromage fondu doivent rester intacts après la stérilisation.

**I.6. Composition et valeur nutritive :****I.6.1. Composition :**

Selon (GILLIS et ECK, 1997) les fromages fondus sont de vrais bâtisseurs de l'organisme avec leurs protéines, sels minéraux, vitamines et éventuellement de la matière grasse.

**I.6.1.1. Eau :**

L'activité biologique de l'eau est primordiale en alimentation. Puisqu'elle permet de mettre en œuvre une stratégie de protection des aliments en contrôlent les détériorations physicochimiques, les activités enzymatiques et la multiplication des populations microbiennes (Ramesh ,2011).

**I.6.1.2. Protéines :**

Les fromages fondus sont des aliments très riches en protéines qui proviennent de la caséine. C'est le constituant principale de fromage qui établit la structure et donne le caractère élastique de fromage, modifiée dont une partie importante se trouve dégradés et solubilisée en oligopeptides et acides aminés sont influence d'une série d'enzymes différentes. La teneur en acides aminés du fromage lui confère une valeur biologique extrêmement élevée (M. Mehmet AK ,2003).

**I.6.1.3. Glucides :**

Le lait de bovin contient le lactose environ 4,8%, sa concentration dans le lait est indépendant de race (**Gerrit S, 2003**) ; Les fromages affinés sont pratiquement dépourvus de glucides car la faible quantité de lactose restant dans le caillé après égouttage est transformé en acide lactique au cours de l'affinage (**GILLIS et ECK, 1997**).

**I.6.1.4. Lipides :**

Les lipides conditionnent l'onctuosité de la pâte fromage. Certains de ces acides gras sont volatils et interviennent dans la formation de l'arôme, les lipides du lait (triglycérides, phosphoglycériques, sphingicidés) se trouve dans le fromage sous forme émulsionnés ce qui le rend plus digestives (**GILLIS et ECK, 1997**).

**I.6.1.5. Vitamines :**

Les fromages sont une source valable de la vitamine K les vitamines liposolubles telles que les vitamines A, D, E et K.

La teneur des fromages en vitamines liposolubles essentiellement vitamine A et D accessoirement vitamine E est directement liée à la richesse de ces derniers en lipide (**Maria S, 2007**).

**I.6.1.6. composition minérale :**

La composition minérale du fromage est présentée dans l'annexe 1.

Le sodium est apporté au fromage sous forme de chlorure de sodium. Ce dernier intervient pour relever la saveur du fromage. On l'utilise aussi pour limiter la prolifération de certaines moisissures indésirable et pour régler l'humidité. Une partie de sodium de fromage fondu provient des sels de fonte, notamment du polyphosphate de sodium. (**GILLIS et ECK, 1997**)

- Le calcium des fromages est bien assimilé par l'organisme humain, Le taux de calcium varie en fonction de la teneur en eau et du mode de fabrication (le fromage fondu <150 mg pour 100 g de produit) ;
- Le phosphore, le potassium, le magnésium et les Oligo - éléments se trouvent dans le fromage particulièrement le fondu sous forme de traces, sa teneur est en générale inférieur à 150 g ce qui correspond à la teneur du lait (**Fredot, 2006**).

### **I.7. Valeur nutritive de fromage fondu stérile :**

Le fromage fondu comporte toutes les caractéristiques nutritionnelles des produits laitiers qui le composent. Il apporte à l'organisme la majorité des nutriments essentiels à un bon équilibre alimentaire.

Comme tous les produits laitiers, c'est une source importante de protéines et de calcium. Du fait de sa conservation et des facilités d'exportation qu'il permet, il peut être un aliment de première importance pour les populations non laitières. En outre, la présence de matière grasse sous forme bien émulsionnée et des protéines finement dispersés lui confèrent une efficacité nutritionnelle notamment digestible au moins égale à celle des composés de départ (GILLIS et ECK, 1997).

### **I.8. Procédé de fabrication de fromage fondu :**

Les procédés de fabrication de fromage se font comme suit (voir Annexe 02) :

#### **I.8.1. Sélection de matière première et contrôle de qualité :**

La sélection de matière est fonction de la formule de produit que l'on veut obtenir. Toutes les matières premières sélectionnés feront l'objet d'un contrôle rigoureux avant l'utilisation quant à leur composition physicochimiques, bactériologiques et leur caractéristiques organoleptiques (GILLIS et ECK, 1997).

#### **I.8.2. Ecrouissage, découpage et broyage des fromages :**

L'égouttage est réalisé traditionnellement par raclage ou brassage mais techniques nouvelles apparaissent telles que les jets d'eau chaud sous pression par exemple. Le broyage est une étape importante du traitement des matières premières, car il est indispensable de dissocier finement les fromages pour obtenir un fromage fondu homogène (GILLIS et ECK, 1997).

#### **I.8.3. préparation de la formule**

La préparation de fromage consiste ont :

- Pesée des matières premières : la principale matière première des fromages fondus est le fromage auquel on associe souvent d'autres produits laitiers. les fromages appartient généralement aux pates pressées cuites ou non cuites, tout l'art de la matière fondeur se trouve dans la sélection est le dosage harmonieux des matières premières (Amadou et Said Amer ,2002) ;

- Mélangé : aux matières fromagères et laitières, on ajoute de l'eau et Sels de fonte, puis on effectue un pré broyage de l'ensemble pendant quelques minutes pour obtenir un mélange prêt à être fondu, la réhydratation des poudres avant mélange est favorable à l'obtention d'un mélange homogène facilitant l'action des sels de fonte (**GILLIS et ECK, 1997**).

#### **I.8.4. Fonte proprement dite :**

Des installations demies en continu ont été développées avec l'utilisation d'un cutter assurant le préchauffage, suivi d'une cuve de mise en continu alimentant des échangeurs de chaleur raclée ; la température atteinte sur ces installations permet d'obtenir une meilleure valeur stérilisatrice. La stérilisation est suivie d'un pré refroidissement jusqu'à 80-90°C, puis d'une étape spécifique de fonte : « le crémage » (**GILLIS et ECK, 1997**)

#### **I.8.5. Crémage :**

Cette étape est essentielle pour la fabrication des fromages fondus à tartiner en portion. En effet, leur texture crémeuse suppose une déstructuration (peptisation) poussée, contrairement aux fromages fondus en tranche ou en bloc. Bien que peu visqueux, ces produits sont des gels. En effet contrairement aux fromages fondus en barquettes qui ne s'écoulent spontanément, les portions doivent conserver leur forme au stockage (**Gaucheron ,2004**) ; L'importance de « crémage » a une influence primordiale sur la texture finale du produit (**Luquet, 1985**).

#### **I.8.6. Homogénéisation :**

On peut éventuellement faire subir au produit une étape d'homogénéisation ; cette dernière améliore la stabilité de l'émulsion de la matière grasse en diminuant la taille des globules gras ; elle améliore la consistance, la structure, l'apparence et l'onctuosité des fromages fondus (**GILLIS et ECK, 1997**).

#### **I.8.7. Conditionnement :**

Le conditionnement des portions de fromage fondu à tartiner, s'effectue dans une feuille en aluminium vernis sur les deux faces, la feuille est préformée par pression sur la machine sous forme d'une coquille qui après remplissage avec la pâte fondue reçoit un couvercle avant l'accomplissement du scellage, le point de scellage se situe entre 60 et 70°C ce qui permet d'utiliser la chaleur du fromage fondu comme énergie de scellage (**Boutonnier, 2000**) ;

L'automatisation du conditionnement permet de réduire considérablement les risques de la pâte après les opérations de pasteurisation ou de stérilisation (**Luquet,1985**).

#### **I.8.8. Refroidissement et stockage :**

Le refroidissement varie en fonction de produit ; il doit être rapide pour les fromages fondus à tartiner et préparation à base de fromage fondu et lent pour le blocs, un refroidissement trop lent. On stocke les produits mis en carton dans des entrepôts dont la température se situe autour de 10 à 15°C (**GILLIS et ECK, 1997**).

#### **I.8.9. Conservation :**

Le fromage fondu est un produit de longue conservation jusqu'à 1an, conservation qui est rendue possible grâce au traitement thermique et à la présence de sels de fonte (**Gaucheron ,2004**) ;

Selon **Luquet(1985)**, certaines précautions élémentaires doivent être prises pour la conservation, le transport et la distribution du fromage fondu, notamment en ce qui concerne les pays chauds :

- Eviter l'écrasement par surcharge et mouillage, surtout lorsqu'il s'agit des boîtes en carton.
- Eviter l'exposition au soleil et le stockage à une température, notamment le passage à 12°C.
- Eviter surtout le brusque changement de température, notamment le passage du froid au chaud, ce qui provoque des condensations détériorant les emballages en carton.

## **II. Additifs alimentaires :**

### **II.1. Sels de fonte :**

Selon **Mahaut et al., (2000)**, les sels de fonte agissent comme émulsifiants, ils sont autorisés dans la limite de 3% du poids du produit fini, sont autorisés par la législation :

- Les polyphosphates de sodium
- Le citrate de sodium
- L'acide citrique

Selon **Molins (1991)**, le rôle des sels de fonte dans la fabrication de fromage fondu est :

- Solubilisation des protéines et séquestration du calcium : la capacité d'un sel de fonte à solubiliser la caséine dépend essentiellement de sa capacité à échanger le calcium du produit laitier contre le sodium qui le contient initialement.
- Ajustement du pH : le pH est ajusté dans une gamme allant de 5,4 à 5,8 selon les propriétés recherchées.
- Fonctions antimicrobiennes : il ne s'agit pas d'un effet bactéricide (les polyphosphates ne détruisent pas les micro-organismes) mais plutôt, d'un effet bactériostatique (**Berger et al., 1989**) ;
- Les phosphates sont également reconnus comme de bons inhibiteurs de la germination des spores, la production des toxines botuliques est généralement empêchée (**tanaka et al., 1979**).

## **II.2. Colorant :**

Pour certaines variétés de fromage fondus on peut renforcer la couleur par l'ajout de la  $\beta$  – carotène à des concentrations bien déterminer pour assurer l'homogénéité de la couleur au cours de la fabrication (**GILLIS et ECK 1997**).

## **II.3. Eau :**

L'humidité des fromages étant généralement faible et puisque l'on incorpore des poudres, il est absolument nécessaire d'apporter de l'eau au mélange, celle –ci permet de solubiliser et de disperser les protéines et d'émulsionner par conséquent la matière grasse libre. Cette eau doit être de qualité alimentaire c'est –à-dire avec une faible teneur en microorganisme et en contaminant chimique tel que nitrate (**Boutonnier,2000**).



## CHAPITRE II : Généralités sur les huiles essentielles

### 1 .Les Oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)

Les Agrumes appartiennent aux genres *Citrus*, *Fortunella* et *Poncirus*. Ces trois genres sont de la famille des « Rutaceae ».

D'après **Swingle in Praloran (1971)**, la position taxonomique des agrumes est la suivante :

Classe : Dicotyledoneae

Sous classe : Archichlonideae

Ordre : Geraniales

Famille : Rutaceae

Sous famille : Aurantioideae

Tribu : Citreae

Sous tribu : Citrinae

Genre : *Citrus*.



**Figure 03:** oranger, *Citrus sinensis* sur tige de 50 (Eden, 2013)

Le genre *Citrus* est celui qui renferme le plus d'espèces et de variétés d'agrumes commercialisées (**Praloran, 1971**)

### 1. Les Oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)

#### 1.1. L'oranger et sa culture

D'une hauteur de 2 à 3 m et d'une durée de vie de 300 à 400 ans, les orangeries prospèrent dans les régions tempérées disposant d'un hiver doux. Ils ont besoin de beaucoup de soleil, de chaleur et d'eau. La différence de température entre l'été et l'hiver et entre le jour et la nuit est importante pour le développement correct de la saveur et de la couleur.

## 1.2.Composition

L'orange contient en moyenne 12 % de glucides (40% de saccharose), de la vitamine C (80mg/100g), vitamines P, B1, B9, E, provitamine A. Riche en calcium (40 mg /100 g), riche en pectines, elle a un rôle de régulateur du transit intestinal. Elle contient une flore mésophile (levures et lactobacilles) indispensable pour une bonne digestion.

En plus de **sa haute teneur en vitamine C**, l'orange est riche en **magnésium** (12,4 mg/100 g en moyenne) en **fibres** (2,8 g/100 g en moyenne). (**Bousbia N ,2004**)

## 1.3. Les Variétés

D'après la nouvelle classification des agrumes, il y a 5 groupes d'oranges douces :

- Oranges précoces douces, blondes et orange communes
- Orange de Valence (variétés juteuses)
- Oranges Navel
- Hybrides d'orange douce
- Oranges sanguines

## 1.4. Utilisation :

Les oranges doivent être choisies en fonction de leur utilisation, il existe des variétés de bouche, comme les Navels, et des variétés à jus, comme les Valencias. Les oranges se conservent très bien à température ambiante, toutefois il est possible de les mettre dans le bac à légumes du réfrigérateur pour limiter leur déshydratation.

Les zestes, c'est-à-dire la partie extérieure de la peau de l'orange, sont également prélevés à l'aide d'un zesteur ou à défaut d'un économe. Ils contiennent des essences odorantes et des huiles essentielles. Celles-ci sont utilisées en alimentation, mais aussi en pharmacie et en parfumerie (**Anonyme2013**).

## 2. Généralités sur les huiles essentielles

### 2.1. Définition :

Les HE sont des mélanges de divers produits issus d'une espèce végétale, ces mélanges passant avec une certaine proportion d'eau lors d'une distillation effectuée dans un courant de vapeur d'eau. Cette définition peut être étendue aux HE obtenues par expression à froid de l'écorce ou zeste des fruits de *Citrus*, à cause de l'intervention de l'eau dans les procédés mécaniques pour entraîner le produit libéré des alvéoles oléifères (**Bousbia, 2004**).

Selon **Bernard et al., (1988)**, le nom d'essences ou huiles essentielles désigne les principes volatiles généralement odoriférants synthétisés par l'organisme végétal. Ces composés ont la propriété de se solubiliser dans les huiles et les graisses. Par conséquent, ils ont reçu empiriquement le nom d'huile essentielle. Le terme « huile » souligne le caractère visqueux et hydrophobe de ces substances et le terme « essentielle » désigne la caractéristique principale de la plante à travers ses exhalaisons.

L'association française de normalisation (**AFNOR, 2000**) définit une huile essentielle comme étant un produit obtenu à partir d'une matière végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques, soit par distillation à sec à partir de l'épicerpe des *Citrus*. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques.

### 2.2. Extraction des huiles essentielles

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétales. En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles, etc.), de la nature des composés (les flavonoïdes, les huiles essentielles, les tanins etc.), le rendement en l'huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées (**Hellal, 2011**).

#### 2.2.1. Pression à froid

Les huiles essentielles d'agrumes sont les seules à être extraites par le procédé de pression à froid (**Lesley, 1996 ; Roux, 2008 ; Ferhat et al., 2010 ; Fillatre, 2011**).

Ce procédé est basé sur la rupture des parois des sacs oléifères. L'essence obtenue est ensuite entraînée par un courant d'eau froide. Une émulsion constituée d'eau et d'essence se forme, l'essence est alors isolée par décantation (**Basil et al., 1998 ; Roux, 2008 ; Ferhat et al., 2010**).

Diverses techniques manuelle ou mécanique, traitant le fruit entier ou seulement les écorces sont utilisées (**Ferhat *et al.*, 2010**).

Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique (**Roux, 2008**).

Cependant l'utilisation de grande quantité d'eau dans ce procédé peut altérer la qualité des huiles essentielles par dissolution des composés oxygénés, par hydrolyse et par transport de microorganismes (**Lucchesi, 2005 ; Ferhat *et al.*, 2010**).



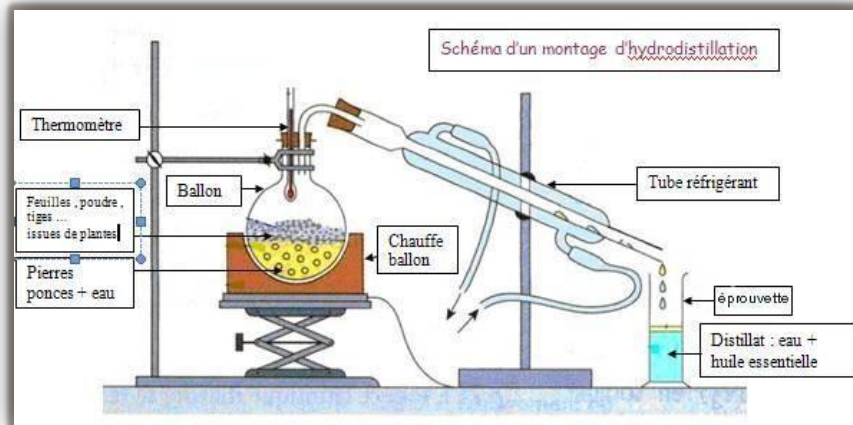
**Figure 04:** L'extraction par pression à froid ou expression (**Anonyme, 2014**)

### 2.2.2. Hydrodistillation

L'hydrodistillation demeure la technique la plus utilisée pour extraire les huiles essentielles et pouvoir les séparer à l'état pur mais aussi de fournir de meilleurs rendements (**Bruneton, 1993 ; Ferhat *et al.*, 2010**).

Le principe consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition, les vapeurs hétérogènes vont se condenser sur une surface froide et l'HE sera alors séparée par différence de densité (**Bruneton, 1993 ; Lucchesi, 2005 ; Baser et Buchbauer, 2010 ; Ferhat *et al.*, 2010**).

Cependant, l'hydrodistillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques (**Lucchesi, 2005 ; Ferhat *et al.*, 2010**).



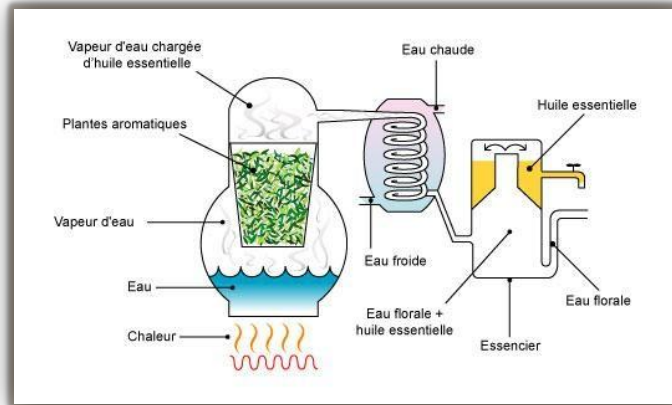
**Figure 05 :** Hydrodistillation ou distillation simple (Fragrance, 2011).

### 2.2.3. Entraînement à la vapeur d'eau

Les parties de plantes utilisées sont déposées sur une grille perforée au-dessus de la base de l'alambic, sans que le matériel végétal ne soit pas en contact avec l'eau (Belaiche, 1979 ; Lucchesi, 2005 ; Ferhat *et al.*, 2010).

Les particules de vapeur d'eau, se dirigeant vers le haut, font éclater les cellules contenant l'essence et entraînent avec elles les molécules odorantes. La vapeur passe ensuite à travers un récipient réfrigérant où la température diminue, provoquant le déclenchement des molécules huileuses des particules de vapeur, qui se condense en eau. L'huile et l'eau se séparent du fait de leurs poids spécifiques différents (Padrini et Lucheroni, 1996).

Pendant l'entraînement à la vapeur d'eau, la matière végétale est exposée à une température élevée et à l'action chimique de l'eau, et dans ces conditions, la fragilité thermique des constituants de l'huile ou l'hydrolyse de certains d'entre eux conduisent à la formation d'artéfacts (Lucchesi, 2005 ; Ferhat *et al.*, 2010).



**Figure 06:** Extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur d'eau (**Anonyme, 2014**)

#### 2.2.4. Autres techniques

Les inconvénients des techniques précédentes ont attiré l'attention de plusieurs laboratoires de recherche et ont permis la mise au point des nouvelles techniques d'extraction des huiles essentielles qui sont beaucoup plus écologiques, en utilisant des solvants moins toxiques et en petites quantités (**Ferhat *et al.*, 2010**).

Parmi ces techniques, figurent : l'extraction assistée par micro-ondes ou ultrasons (**Kaufmann et Christen, 2002 ; Hemwimon *et al.*, 2007 ; Piochon, 2008 ; Ferhat *et al.*, 2010 ; Dupuy, 2010**), l'extraction par les fluides supercritiques ou encore l'eau à l'état subcritique (**Kaufmann et Christen, 2002 ; Piochon, 2008 ; Ferhat *et al.*, 2010 ; Dupuy, 2010**), l'extraction par la détente instantanée contrôlée, l'extraction par solvants sous pression et l'extraction par la flash détente (**Ferhat *et al.*, 2010**).

### 2.3. Méthodes d'identification des huiles essentielles

#### 2.3. 1. La Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. La CPG est la technique usuelle dans l'analyse des huiles essentielles. Elle permet d'opérer la séparation de composés volatils de mélanges très complexes et une analyse quantitative des résultats à partir d'un volume d'injection réduit (**Arpino *et al.*, 1995**).

### **2.3.2. Le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/Spectrométrie de Masse (CPG/SM) :**

D'un point de vue analytique, d'importants progrès ont été réalisés en couplant la CPG avec des appareils tels que le spectromètre de masse (SM).

La CPG couplée à la SM est la technique de routine la plus utilisée pour l'analyse des huiles essentielles. Le principe de la spectrométrie de masse consiste à bombarder à l'aide d'électrons une molécule qui sera fragmentée ; les différents fragments obtenus, chargés positivement, constituent le spectre de masse de cette molécule. Très souvent, le spectre de masse est caractéristique d'une molécule donnée et, en théorie, il est donc possible d'identifier un composé en comparant son spectre à ceux de composés de référence, contenu dans des bibliothèques de spectres informatisées commerciales (Adams, 2001).

Dans la pratique, l'utilisation conjointe de la spectrométrie de masse (utilisation conjointe de banques laboratoire et littérature) et des indices de rétention calculés sur deux colonnes de polarité différente en CPG, permet, en général l'identification d'un grand nombre de constituants dans les mélanges complexes tels que les huiles essentielles (Lianga et al., 2004 ; Senatore et al., 2004).

## **2.4. Activités biologiques des huiles essentielles**

### **2.4.1. Activité antioxydant de l'huile essentielle**

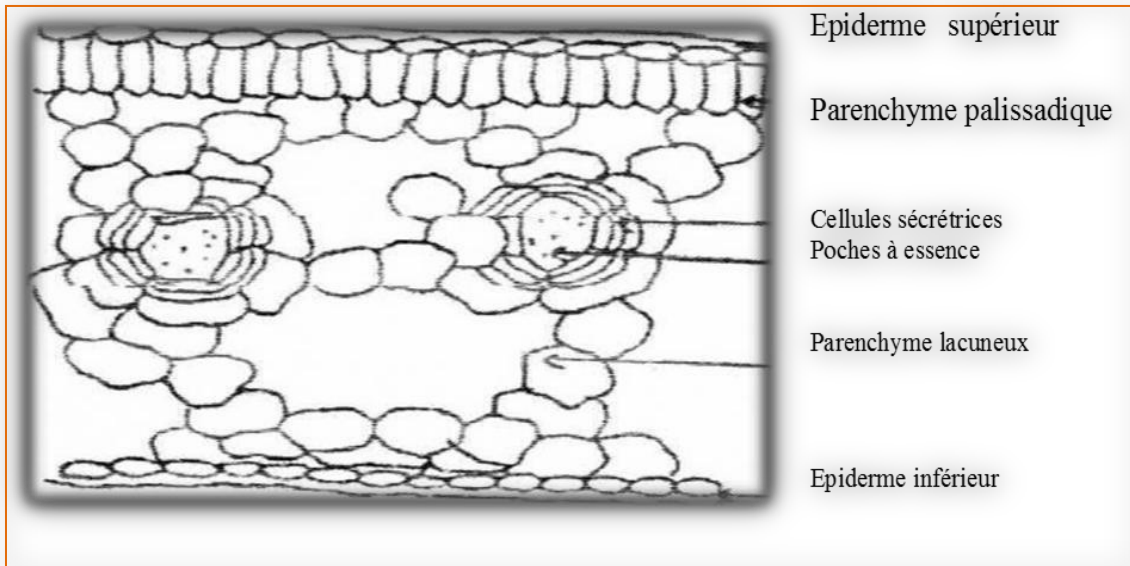
L'activité antioxydante est un ensemble des actions qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques et capable de réagir avec les radicaux libres et les rendent inoffensifs (neutraliser et les dégrader).

Il est un système de protection qui lui permet de lutter contre les radicaux libres (Amazal, 2010).

## **2.5. Localisation et lieu de biosynthèse de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* :**

Les plantes du genre *Citrus* font partie de la famille des *Rutaceae* qui sont caractérisées par la présence, dans les feuilles, fleurs, tiges et péricarpes des fruits, de poches schizolysigènes contenant de l'essence aromatique. Ce sont des poches dont la formation initiale est identique à celle des poches schizogènes, mais en plus des cloisonnements radicaux, les cellules sécrétrices de bordure subissent également des cloisonnements tangentiels, ce qui donne plusieurs assises de cellules sécrétrices (Goris, 1967). Dans les fleurs de plantes du genre *Citrus*, les poches sécrétrices se situent dans le parenchyme des pétales, sous l'épiderme.

Le fruit du *orange* se compose de l'épicarpe, l'endocarpe et du mésocarpe. Ce dernier comprend l'albédo et le flavédo qui est une zone colorée contenant les poches schizolysigènes réparties de façon très irrégulière (**Figure 7**) (**Ferhat *et al.*, 2010**).



**Figure07:** Poches sécrétrices des huiles essentielles des *Citrus* dans feuilles

## 2.6. Domaines d'application des huiles essentielles

Les huiles essentielles commercialisées dans le monde sont destinées à quatre grands secteurs industriels : parfumerie cosmétique ; parfumerie technique (savons, détergents) ; alimentation et médecine (médecine douce et pharmaceutique) (**Grysole, 2005**). L'industrie alimentaire utilise les huiles essentielles pour rehausser le goût, aromatiser et colorer les aliments (**Pingot, 1998; Bruneton, 1999 ; Grysole, 2005 ; Aprotosoie *et al.*, 2010**).

Le secteur des boissons gazeuses s'avère un gros utilisateur d'huiles essentielles (**Grysole, 2005**).

Les huiles essentielles possèdent des profils de composition chimique différents. Elles sont utilisées comme agents naturels de conservation des aliments. Leur utilisation comme agents de conservation est due à la présence de composés ayant des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (**Conner, 1993 ; Hammer *et al.*, 1999**).

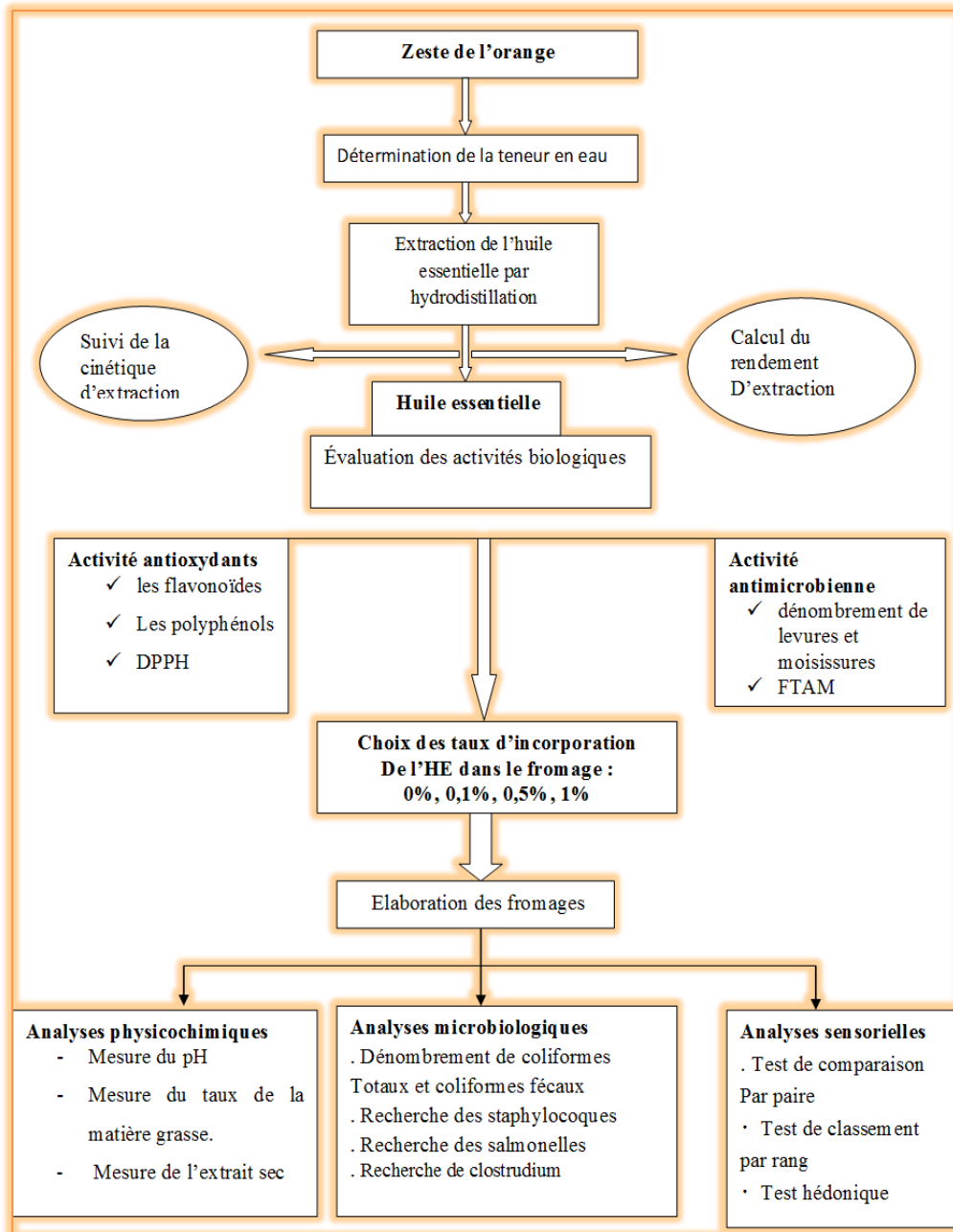
L'huile essentielle la plus utilisée dans le monde est celle de l'orange (**Grysole, 2005**).



## Matériel et méthodes

Notre travail consiste initialement à collecter du zeste d'orange afin d'extraire l'huile essentielle pour l'utiliser par la suite comme un agent aromatisant et conservateur dans le fromage fondu fabriqué à la laiterie et fromagerie Boudouaou à Boumerdes.

Le Protocol suivi dans notre étude est décrit dans l'organigramme suivant :



**Figure 08 :** Organigramme de la méthodologie d'étude

## 1. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle est effectuée au laboratoire de la faculté de science de la nature et de la vie de l'université de Bouira.

### 1.1. Matériel végétal

L'huile essentielle testée a été extraite à partir de l'écorce ou zeste du l'orange (*Citrus sinensis*), variété *Eurêka*.

Le zeste est la partie du fruit la plus riche en huile essentielle par rapport aux autres parties (**Robert et Lobstein, 2005**).

La collecte du fruit a été effectuée durant les mois janvier, février et mars 2018, les caractéristiques déterminées sur le fruit récolté sont : la couleur, la forme qui sont évalués par une analyse visuelle à l'œil nu, l'épaisseur de l'écorce, le poids du fruit entier ainsi celui de zeste par une balance analytique.

Avant l'utilisation du fruit, il doit subir un lavage par l'eau pour éliminer les souillures et les tâches noires qui se trouvent à la surface du fruit, puis un essuyage par un chiffon propre.

### 1.2. Extraction de l'huile essentielle :

L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation (**Benchekroum et al., 2004**).

Une quantité de 200 g de zeste du l'orange est introduite dans un erlenmeyer à deux cols de 2L rempli d'eau distillée jusqu'aux deux tiers de sa capacité (d'environ 1200 ml). L'ensemble est ensuite mis à ébullition pendant une durée déterminée après le suivi de la cinétique d'extraction.

L'erlenmeyer ainsi chauffé, produit de la vapeur chargée de produits volatils. Cette vapeur se condense au contact d'un réfrigérant ; le condensât est recueilli dans une ampoule à décanter où s'effectue la séparation des deux phases non miscibles : phase aqueuse et phase organique, cette dernière constitue l'huile essentielle qui sera traitée avec du sulfate de sodium anhydre pour éliminer toutes traces d'eau (**Chanthaphon et al., 2008**).

L'huile obtenue est conservée dans un réfrigérateur à une température de 4°C, dans des flacons en verre emballés avec du papier aluminium en vue de son analyse et de son incorporation dans le fromage.

### 1.3. Suivi de la cinétique d'extraction

Selon Bachelot *et al.*, (2006), la cinétique d'extraction a pour but de fixer le temps nécessaire pour extraire le maximum d'huile et pour éviter les pertes du temps et d'énergie. Cette cinétique consiste à déterminer le rendement en fonction du temps d'extraction.

Dans notre étude, le rendement a été déterminé chaque 15 minutes en tenant compte du temps d'extraction dès la formation de la première goutte du distillat, cette étape correspond à la montée de la température d'ébullition d'eau.

### 1.4. Calcul du rendement d'extraction :

Selon la norme AFNOR (1986), le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction et la masse de la matière végétale utilisée. Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$$\text{RHE \%} = \frac{M_{\text{HE}}}{M_{\text{VS}}} \times 100$$

Dans laquelle :

RHE : Rendement en huile essentielle (%) ;

$M_{\text{HE}}$  : Masse de l'huile essentielle (g) ;

$M_{\text{VS}}$  : Masse de la matière végétale sèche (g).

### 1.5. Caractéristiques organoleptiques :

L'huile d'orange est un liquide de couleur jaune clair, d'odeur caractéristique semblable à celle de l'orange.

### 1.6. Détermination de taux d'humidité AFNOR 1982 :

Le taux de l'humidité de la matière végétal a été déterminé par la méthode ou par la méthode « NF T 60-305, juin (1976) normalisé, décrite par AFNOR 1982 ou par la méthode physique qui consiste à en introduire 10g broyés d'échantillon et placés dans une coupelle tarée elle-même positionnée dans une étuve réglée à  $103^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Les échantillons sont ensuite pesés avec précision de toutes les 24h, après avoir refroidis à température ambiante dans un dessiccateur, et ce jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

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

$$H\% = [(M_1 - M_2) \times 100] / P$$

Dans laquelle :

$M_1$  : masse de l'ensemble capsule et la matière végétale avant étuvage

$M_2$  : masse de l'ensemble capsule et la matière végétale après étuvage

$P$  : masse de la prise d'essai.

## 2. Détermination des indices physico-chimiques

De nos jours, les propriétés physiques (densité, indice de réfraction, pouvoir rotatoire) et chimiques (solubilité dans l'alcool, indice d'acide et indice d'ester) sont exigées pour l'évaluation commerciale des huiles essentielles.

### 2.1. Détermination des indices physiques

#### 2.1.1. La densité relative (NF ISO 6883) :

La densité de l'huile essentielle correspond au rapport entre la masse d'un certain volume de l'essence et la masse du même volume d'eau pris à la même température.

$$D_{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Dans laquelle :

$m_0$  : la masse en gramme de pycnomètre vide

$m_1$  : la masse en gramme de pycnomètre rempli d'eau distillée

$m_2$  : la masse en gramme de pycnomètre rempli d'huile

### 2.1.2. Indice de réfraction (ISO 6320) :

L'indice de réfraction est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante 20°C.

L'indice de réfraction est largement supérieur à 1 pour les huiles essentielles, sa mesure sera mentionnée avec 3 ou 4 chiffres après la virgule. L'appareil le plus couramment utilisé pour mesure l'indice de réfraction est le réfractomètre d Abbe, les indices de réfraction sont déterminés dans l'intervalle 1,300 à 1,700.

Pour se calculer, le réfractomètre de marque Abbe, est préalablement étalonner par l'eau distillé dont leur indice de réfraction est connu ( $I_r(\text{eau}) = 1,335$ ) à la température fixée à 20°C.

- les prismes sont ensuite séchés et quelques gouttes d'HE ont été déposés entre les deux faces des prismes. À l'aide de l'oculaire et le bouton de réglage, l'interface entre la zone sombre et éclairée est amenée au centre du réticule. Les irisations sont supprimées pour obtenir une ligne nette entre les deux zones. Puis la valeur de l'indice est notée par l'échelle de lecture. On effectue la correction à 20 °C par le biais de la formule suivante:

$$I_{20} = I_t + 0.00045 (t - 20^\circ \text{C})$$

Dont :

**$I_{20}$**  = Indice à 20° C.

**$I_t$**  = Indice à la température ambiante ou de mesure.

**$T$**  = température ambiante.

### 2.1.3. Miscibilité à l'éthanol (NF T 75-113) :

Une huile essentielle est dite miscible à un volume et plus d'éthanol de titre alcoométrique déterminé, à la température de 25°C, lorsque le mélange d'un 01 volume d'huile essentielle considérée avec V volumes de cet éthanol est limpide et le reste après addition graduelle d'éthanol de même titre.

**Protocole expérimentale :** Dans un erlenmeyer contenant 1 ml d'HE, on verse de l'éthanol à 70% par fraction de 0,2 ml à l'aide d'une burette de 20 ml en agitant après chaque ajout. Lorsqu'une solution limpide est obtenue on note le volume d'alcool ajouté.

## 2.2. Détermination des indices chimiques :

En plus des caractères physiques, on peut par des méthodes chimiques doser les fonctions (acide, ester, alcool, carbonyle ...) Présentes dans les HE. Ces derniers permettent non seulement de mettre en évidence la présence des fonctions organiques mais aussi de mesurer leurs proportions dans le mélange que sont les essences.

### 2.2.1. Indice d'acide (NF EN ISO 660) :

La teneur en acide gras libre d'une HE s'exprime de deux façons : l'acidité et l'indice d'acide qui sont déterminés expérimentalement de la même manière et seul le mode d'expression est différent.

L'indice d'acide est le nombre de milligrammes de potasse (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides libres renfermés dans un 01 gramme d'HE.

**Protocole expérimentale :** 1g d'HE, 5ml d'éthanol à 96% et environ 5 gouttes d'indicateur coloré (phénophtaléine) sont introduites dans un erlenmeyer. Le mélange ainsi formé est titré par une solution alcoolique de potasse (KOH) 0,1 N jusqu'à ce jour ce que la solution vire au rose.

Expression des résultats :

L'indice d'acide  $I_a$  est déterminé par la formule suivante :

$$I_a = V.C. \frac{56.11}{m}$$

Dans laquelle :

V : volume en ml de la solution de KOH utilisée pour le titrage.

C : concentration en mole /L de la solution KOH

m : masse en g de la prise d'essai

### 2.2.2. Indice d'ester : ( AFNOR NF T 75-006)

L'indice d'ester est le nombre de milligramme de potasse KOH nécessaire pour neutraliser les acides libérés par hydrolyse en milieu basique saponification des esters contenus dans 1g d'essence.

**Protocole expérimental :** Dans un ballon de 100 ml, on introduit 1 g d'HE et 25 ml d'une solution alcoolique de potasse (KOH) 0,5 M à l'aide d'une burette, ainsi que quelques fragments de pierre de ponce. On adapte au ballon un réfrigérant et on porte le mélange au reflux pendant une (01) heure. Après refroidissement de la solution, on ajoute 20 ml d'eau distillé et 5 gouttes de phénophtaléine. Puis, l'excès de KOH est titré avec une solution d'acide chlorhydrique (HCL) 0,5 N jusqu'à la disparition de la couleur rose.

Parallèlement, une opération à blanc est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment en utilisant les mêmes réactifs.

#### Expression des résultats

L'indice d'ester ( $I_e$ ) est calculé à l'aide de la relation suivante :

$$I_e = \frac{28.05}{m} (V_0 - V_1) - I_a$$

Dans laquelle :

$V_0$  : Volume en mL de la solution d'HCL (0,5 N) mesuré pour l'essai à blanc.

$V_1$  : Volume en mL de la solution d'HCL (0,5 N) mesuré pour le calcul de  $I_e$ .

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

$I_a$  : valeur d'indice d'acide.

### 2.2.3. Indice de saponification (NF ISO 3657) :

L'indice de saponification est le nombre en milligrammes de potasse caustique (KOH), nécessaire pour transformer en savon les acides gras et les triglycérides d'un 01 gramme de corps gras.

Le principe consiste à titrer l'excès d'hydroxyde de potassium en solution par l'acide chlorhydrique.

**Protocole expérimental :** Mettre 2g d'huile dans une fiole muni d'un réfrigérant puis ajouter 25 ml de solution éthanolique de KOH (0,5 N), en suite on porte le mélange en ébullition en agitant de temps en temps pendant 1h. Ensuite, on ajoute 3 gouttes de phénophtaléine. La solution savonneuse est titrée avec HCL (0,5N).

Parallèlement, on a effectué un essai à blanc dans les mêmes conditions.

### Expression des résultats :

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

$$I_s = \frac{N \cdot (V_0 - V)}{P} \quad (\text{mg KOH} / \text{g d'H.E})$$

Dans laquelle :

$V_0$  : Volume en ml de la solution d'acide chlorhydrique pour l'essai à blanc ;

$V$  : Volume en ml de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour la prise d'essai ;

$N$  : normalité exacte de la solution chlorhydrique ;

$P$  : poids en gramme de la prise d'essai.

#### 2.2.4. Indice d'iode (NF ISO 3961) :

L'indice d'iode est le nombre de grammes d'iode que peuvent fixer les doubles liaisons de 100 grammes de substance. Quel que soit le réactif halogène utilisé, le principe est le même. Les liaisons éthyliques fixent les halogènes d'après la réaction suivante :

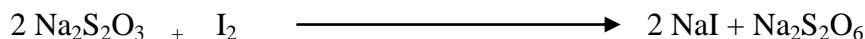


$X = \text{Cl, Br, I}$

Cette réaction d'addition peut être utilisée pour déterminé quantitativement l'instauration globale des constituants de l'essence. Il est indispensable, pour obtenir une addition quantitative. D'utiliser un excès de réactif pendant u temps de contact suffisamment



long, ou en présence de catalyseur et de titrer ensuite l'excès de réactif iode non fixé par un réducteur par exemple le thiosulfate), on détermine ainsi la quantité d'iode fixé par l'HE.



**Protocole expérimental :** On pèse 0,2 g d'HE dans un ballon à fond plat puis on ajoute 10 ml d'éthanol pur suivi d'une agitation. On additionne au ballon 10 ml d'iode 0,2N dans l'éthanol et on agite afin de bien dissoudre. On ajoute ensuite 30 ml d'eau distillée puis on ferme le ballon par son bouchon en verre et on agite pendant 5 min. puis on ouvre le bouchon et on rince les parois du ballon avec très peu d'eau distillée contenue dans une pissette.

On titre alors le contenu du ballon placé sous une burette graduée remplie de thiosulfate de Na 0,1N jusqu'à l'apparition d'une coloration jaune. On verse ensuite 1 ml de la solution d'empois d'amidon au mélange dont la couleur vire au bleu violet foncé. On continue la titration jusqu'à la disparition de cette coloration bleu violet foncé et soit V ml la chute de burette de thiosulfate versée. On effectue en parallèle un essai a blanc soit  $V_1$  ml le volume la chute de burette correspondante.

#### Expression des résultats :

L'indice d'iode est calculé par la formule suivante:

$$I_i = \frac{N_T(V_0 - V_1)}{m}$$

Dans laquelle :

$N_T$  : Normalité de la solution de thiosulfate de sodium.

$V_0$  : Volume en ml de la solution de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  utilisé pour l'essai à blanc.

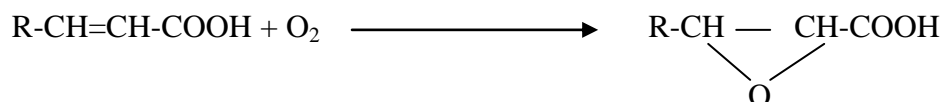
$V_1$  : Volume en ml de la solution de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  utilisé pour la détermination d' $I_i$ .

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

#### 2.2.5. Indice de peroxyde (NF T 60-220 et ISO 3960) :

On définit l'indice de peroxyde comme étant le nombre de milliéquivalent d'oxygène par kilogramme de cors gras et oxydant l'iodure de potassium avec libération d'iode.

En présence de l'oxygène de l'air, les acides gras insaturés entrant dans la composition des essences s'oxydent en donnant des peroxydes :



Le principe repose sur le traitement d'une prise d'essai, en solution dans l'acide acétique et du chloroforme, par une solution d'iodure de potassium, puis le titrage de l'iode par une solution titré de thiosulfate de sodium. Le dosage de peroxydes formés se fait indirectement en présence d'iodure de potassium.



**Protocole expérimental** : On pèse 2g d'huile d'orange dans un flacon de 100ml puis 10ml de chloroforme sont ajoutés. On agite pour dissoudre et on ajoute ensuite au mélange 15ml d'acide acétique pur et 1ml d'une solution d'iodure de potassium saturée.

Après avoir fermé le flacon, on laisse reposer 5min à l'obscurité et on ajoute 75ml d'eau distillée et quelques gouttes d'empois d'amidon. L'iode libéré est titré par la suite avec une solution de thiosulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) 0,01 N. Parallèlement, un essai à blanc est réalisé dans les mêmes conditions.

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

$$I_p = \frac{V_0 - V}{P} \quad (\text{még.O}_2 / \text{kg d'HE})$$

Dans laquelle :

V : volume de la solution de thiosulfate de sodium utilisé pour l'essai.

$V_0$  : volume de la solution de thiosulfate de sodium utilisé pour l'essai à blanc

P : prise d'essai en gramme.

### 3. Analyse chromatographique :

Les analyses chromatographiques ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse à régulation électronique de pression de type Chrompack CP 9002, équipé d'une colonne capillaire en silice fondue de type DB-5 de 30 m de longueur, 0,25 mm de diamètre et

0,25  $\mu\text{m}$  d'épaisseur de film, d'un détecteur à ionisation de flamme réglé à 280°C et alimenté par un mélange de gaz H<sub>2</sub>/air et d'un injecteur split splitless réglé à 250°C. Le gaz vecteur est l'azote à 1 ml/min. Le mode d'injection est split (rapport de fuite de 1/50, débit de fuite 66 ml/min). La température de la colonne est programmée de 50°C (3mn) à 250°C à raison de 2°C/min, puis est maintenue à 250°C pendant 10 min. (Méthode de calcul des indices de Kovats : IK voir annexe 04).

#### 4. Evaluation des activités biologiques de l'huile essentielle de *Citrus sinensis* :

##### 4.1. Evaluation de l'activité antioxydante :

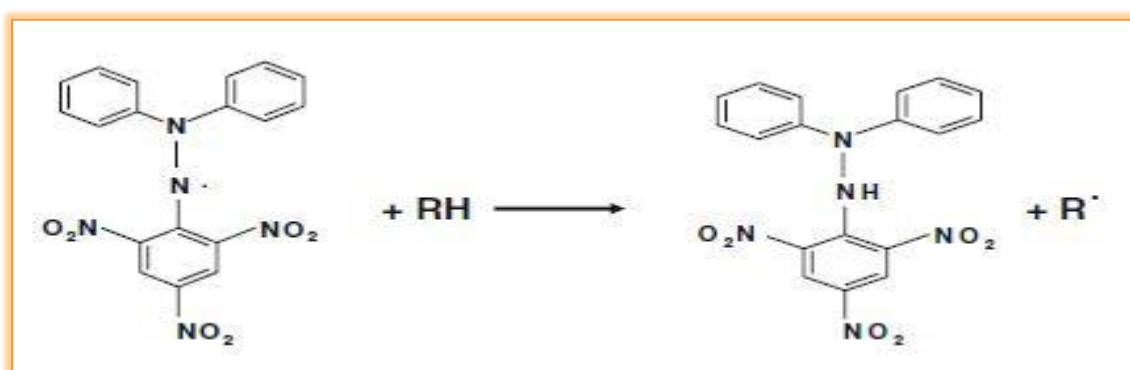
Les tests de l'activité antioxydante ont été effectués au niveau de laboratoire de la faculté de science de la vie et de la nature (SNV) à Bouira.

L'activité antioxydante de l'huile essentielle a été évaluée par la méthode de la mesure de pouvoir de piégeage de radical DPPH.

##### 4.1.1 Test du DPPH :

**Principe :** Le DPPH (2,2 diphenyl-1-picryl hydrazyl) est un radical stable qui possède un électron célibataire sur l'atome d'azote, caractérisé par une couleur violette et un pic d'absorption spectral maximal à 517nm. En présence d'antioxydant l'électron célibataire devient apparié, ce qui conduit à la décoloration de DPPH du violet (forme radicalaire DPPH $\cdot$ ) au jaune (forme réduite DPPH-H) (**Figure 09**).

Cette décoloration représente donc la capacité d'échantillon de piéger ce radical. (**Morikawa T et al.,2004**)



DPPH $\cdot$  (violet) (radical libre)

DPPH-H (Jaune) (mono radicale)

**Figure 09** : Structure de DPPH et mécanisme de sa réduction par un antioxydant (**Morikawa T et al.,2004**)

**Préparation de l'extrait méthanolique :**

Dans un bécher peser 0,3g de l'huile essentielle de l'orange puis verser 30ml de méthanol et maintenu sous agitation pendant 10 minutes

**Mode opératoire :**

- 1- Une solution de DPPH (0,1mm) a été préparée fraîchement
- 2- Dans un tube à essai introduire 2 ml de l'extrait méthanolique puis additionner le 2 ml de méthanol (la dilution S/2)
- 3- Prélever 2 ml de la dilution S/2 et l'introduire dans un tube à essai qui contient 2 ml de méthanol (la dilution S/4) suivi ce protocole pour réaliser les autres dilutions.
- 4- 1ml de la solution DPPH préparée est introduit dans chaque tube à essai.
- 5- Les dilutions ont été bien agitées et incubées dans l'obscurité pendant 1 heure à la température ambiante.
- 6- L'absorbance a été mesurée à 517 nm.
- 7- Un témoin est préparé en remplaçant l'extrait méthanolique par le même volume de méthanol.

**Expression de résultats :**

Le pourcentage d'inhibition des radicaux dus à la propriété antioxydant des extraits a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(Ac - Ae) / Ac] \times 100$$

Où :

Ac : absorbance de contrôle.

Ae : absorbance de l'échantillon.

**4.1.2. Quantification des poly phénols totaux :**

**Le principe :** Le dosage des composés phénoliques totaux est effectué par la méthode colorimétrique de Folin- Ciocalteu décrite par (Sfahlan et al., 2010)

Le principe de la méthode repose sur l'oxydation des hydroxyles des composées phénoliques par le mélange d'acide phosphomolybdique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et phosphotungstique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) qui constitue le réactif de Folin -Ciocalteu (de couleur jaune). La réduction de ces acides donne naissance à des oxydes de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ) colorés en

bleu. Cette coloration, dont l'absorbance mesurée à 760nm, est proportionnellement au taux des composés phénoliques (**Riberau-Gayon, 1968**).

**Mode opératoire :** Pour le dosage des poly phénols totaux, 0,5 ml de chaque extrait est mélangé à 5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu. Après 3 minutes de repos, 0,5 ml de carbonate de sodium (10%) a été ajouté. Le mélange est ensuite homogénéisé et incubé à la température ambiante pendant 1 heure et à l'abri de la lumière. Au bout de ce temps, l'absorbance a été déterminée par la lecture à 760 nm à l'aide d'un spectromètre UV-Visible

La détermination de la concentration en polyphénols totaux est effectuée en se basant sur une courbe d'étalonnage préparée dans les mêmes conditions, à partir d'une série de dilutions d'acide gallique (tableau.). La concentration finale en ces composés a été exprimée en mg d'équivalents d'acide gallique par gramme de matière.

La préparation de la courbe d'étalonnage est expliquée dans l'annexe n 05.

#### **4.1.3. Dosage des flavonoïdes :**

**Le principe :** La détermination de la concentration en flavonoïdes totaux est effectuée en utilisant la méthode du trichlorure d'aluminium.

Le principe de la méthode est basé sur le fait que les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre en position 5 qui est susceptible de donner, avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (**Riberau-Gayon, 1968**).

**Mode opératoire :** Pour le dosage des flavonoïdes totaux, un volume de 1 ml de chaque extrait est mélangé avec 1 ml de la solution de chlorure d'aluminium  $AlCl_3$  à 2 %. Après l'agitation et l'homogénéisation, le mélange est incubé à la température ambiante pendant 1 heure et à l'abri de la lumière. Au bout de ce temps, l'absorbance maximale a été mesurée à 430 nm à l'aide d'un spectromètre UV-Visible.

## 4.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne :

Les tests de l'activité antimicrobienne sont réalisés au niveau de laboratoire d'hygiène de l'établissement public de santé de Bouira.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle testée a été réalisée par deux méthodes : la recherche et le dénombrement des levures et moisissures (NF V 08-059) et la recherche et le dénombrement de la flore aérobie mésophile totale (FTAM).

### 4.2.1. Recherche et dénombrement des levures et moisissures dans l'huile essentielle d'orange (NF V 08-059) :

#### a- Préparation des échantillons d'HE :

Les solutions de l'huile essentielle HE ont été préparées avec de l'éthanol à 96% est testées à des différentes concentrations (voir le tableau 02)

Pour cela, nous avons préparé une solution mère à une concentration de 0.5g/L. à partir de laquelle ont été préparées les trois autres solutions.

Les concentrations d'HE correspondantes à chacune des dilutions obtenues à partir de la solution mère sont indiquées dans le tableau.

**Tableau 02 :** concentrations des solutions d'HE testées

Dilution	$5 \cdot 10^{-1}$	$10^{-1}$	$5 \cdot 10^{-2}$	$10^{-2}$
Conc.mg / mL	5	1	0,5	0,1

#### b- Mode opératoire :

Le milieu de culture OGA préalablement fondue et refroidie a été répartie dans des boites de pétri vides. Après solidification, 1ml de l'huile essentielle de l'orange a étéensemencé en surface.

On étale à la surface de milieu 1 ml de chaque dilution.

L'incubation a été faite à une température de 25° C pendant 3 à 5 jours.

La lecture et le dénombrement ont été réalisés tous les jours, levures à part et moisissures a part pour suivre le développement et éviter l' envahissement.

Une boite du milieu utilise a été incubée telle quelle, dans le même endroit et dans les mêmes conditions de température, elle constitue le témoin du milieu (NF V 08-059).

**c- Lecture :** On ne retient pour le comptage que les boites contiennent entre 15 et 300 colonies.

#### 4.2.2. Recherche et dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (NF V08-051,1999)

La flore mésophile aérobie totale (FMAT), bon indicateur de contamination, est dénombrée sur gélose PCA incubée pendant 48 h à 72 h à 37°C

##### a- Mode opératoire :

A partir des dilutions décimales, porter aseptiquement 1ml de l'huile essentielle de l'orange et ensemencé en profondeur.

Compléter ensuite avec environ 15 ml de gélose PCA fondue puis refroidie à l'air libre. Faire ensuite des mouvements circulaires et de va et vient en forme 8 pour permettre l'inoculum de se mélanger à la gélose.

Laisser solidifier sur pailleasse. Les boîtes seront incubées, à 30°C pendant 72 heures, en faisant une lecture chaque 24h.

Une boîte du milieu utilise a été incubée telle quelle, dans le même endroit et dans les mêmes conditions de température, elle constitue le témoin du milieu

##### b- Lecture :

Retenir les boîtes contenant un nombre de colonies compris entre 30 et 300.

Les résultats sont exprimés en nombre de germes par « ml » ou « g » de produit selon la formule suivante :

$$N = \frac{\sum \text{colonies}}{V \times D}$$

N : nombre de germe par ml ou g de produit.

$\sum$  Colonies : sommes des colonies des boîtes interprétables.

V : volume de l'inoculum. (ml)

D : facteur de dilution considérée.

## **5. Incorporation de l'huile essentielle dans le fromage fondu :**

L'ensemble des travaux de cette partie est effectué dans la laiterie et fromagerie de Boudouaou à Bomerdès et aux laboratoires de physicochimie et de microbiologie de la laiterie. (Voir annexe 06). Les analyses sensorielles ont été réalisées au niveau du laboratoire de la faculté de SNV.

### **5.1. Fabrication de fromage fondu incorporé de l'huile essentielle d'orange :**

L'ajout de l'huile essentielle est effectué au niveau du laboratoire microbiologique dans des conditions stériles.

Le conditionnement est réalisé manuellement dans des boîtes aluminium stériles de 100g, emballés avec du papier aluminium et stockés à 4°C

Les trois doses incorporées dans le fromage fondu 0.1ml/100g, 0.5ml/100g, Et 1ml/100g. Sont fixées à partir des recherches des travaux précédentes et l'analyse sensorielles préliminaires. (Zellnar et al., 2010).

### **5.2. Détermination de l'effet de l'incorporation de l'huile essentielle :**

Les effets de l'incorporation de l'huile essentielle sur le fromage fondu ont été évalués par le suivi de l'évolution des paramètres, physico-chimiques, microbiologiques et sensorielles. Pour cela, des prélèvements à partir des échantillons du fromage fondu témoin A (non incorporé), B incorporé avec 0, 1 ml/ 100g, C 0.5 ml/ 100g et D 1ml/100g de l'HE ont été effectués tous les deux jours à partir du premier jour de fabrication jusqu'à 16 jours de stockage à 4°C.

#### **5.2.1. Analyses physicochimiques :**

##### **5.2.1.1. Mesure de pH : (AFNOR1980)**

**Principe :** la mesure de pH de fromage fondu est basée sur la lecture directe de la valeur du pH sur le pH mètre.

**Mode opératoire :** l'opération consiste à introduire directement l'électrode déjà étalonnée dans le produit fini et lire directement la valeur du pH donnée.

##### **5.2.1.2. Détermination de la teneur en matière grasse (Norme AFNOR, NFV04-346) :**

**Principe :** il est basé sur la dissociation des protéines du fromage par l'addition de l'acide sulfurique et séparation de la matière grasse par centrifugation dans un butyromètre de Van – Gulik.



**Mode opératoire :** Dans un butyromètre de Van – Gulik, mettre 3g de fromage, additionner l'acide sulfurique de manière qu'il couvre la masse de fromage, en faisant dissocier les protéines dans un bain marie. Après la dissociation complète en rempli la tige graduée par l'acide sulfurique, ajoutant 1ml de l'alcool iso amylique. La séparation de matière grasse se fait par centrifugation.

La matière grasse exprimée en g/100g de fromage est obtenu par la lecture directe sur l'échelle de butyromètre.

### **5.2.1.3. Détermination de la matière sèche totale EST : (AFNOR, 1980)**

**Principe :** la détermination de l'extrait sec total est reposée sur la dessiccation par l'évaporation de l'eau a + 80°C d'une quantité de fromage fondu. La matière sèche est exprimée en pourcentage en masse.

Cette expérience est réalisée à l'aide d'un dessiccateur, ce dernier est équipé d'une balance et une résistance.

**Mode opératoire :** on met à l'intérieur du dessiccateur une prise d'essai de 1,2 à 1,5g de fromage fondu sur une feuille d'aluminium, on règle la température de séchage à 95°C. On laisse évaporer le fromage pendant quelque minute. Le résultat est inscrit sur l'écran de l'appareil, ceci indique le pourcentage de l'extrait sec total.

## **5.2.2. Les analyses microbiologiques :**

Selon l'arrêté interministériel du 27 /05/1998, les germes recherchés et dénombrés dans le fromage sont : les coliformes totaux, les coliformes fécaux, *Staphylococcus aureus*, les *Clostridium*s, les *Salmonelles*.

### **5.2.2.1. Préparations des solutions mères et des dilutions décimales :**

La solution mère est obtenue en mélangeant dans un flacon vide tarée 10à 15 g de fromage avec de l'eau physiologique. Après homogénéisation, Par la suite, des dilutions successives sont effectuées jusqu'à  $10^{-6}$ .

1ml de la dilution  $10^{-1-n}$  a été introduit dans un tube à assai contenant 9 ml de l'eau physiologique pour obtenir la dilution  $10^{-n}$  (Guiraud, 2003).

### **5.2.2.2. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux :**

Le dénombrement des coliformes dans le produit fini met en évidence une pollution fécale et donc la possibilité d'une contamination par les entérobactéries pathogènes. Ces

bactéries sont sensibles à la chaleur. Elles sont donc un bon témoin de l'efficacité des traitements thermiques et/ou d'une ré-contamination. De plus, elles sont en elles-mêmes un facteur de mauvaise conservation ou d'accidents de fabrication. Les coliformes appartiennent à la famille des *Entérobacteriaceae*, ce sont des bacilles à Gram <sup>-</sup> non sporulés, aéro-anaérobies facultatifs, oxydase-, catalase<sup>+</sup>.

**Principe :** Les coliformes sont capables de se multiplier en présence de sels biliaires et capable de fermenter le lactose avec production d'acide et de gaz en 24 à 48 heures à une température de 37°C. Le milieu utilisé est le milieu désoxycholate contenant les sels biliaires, le vert brillant comme agents sélectifs, qui inhibent la croissance de la flore secondaire Gram+.

**Mode opératoire :** A partir des dilutions décimales, porter aseptiquement 1ml dans une boîte de pétri vide et stérile préparée à cet usage et numéroter. Compléter ensuite environ 15ml de gélose Désoxycholate fondue puis refroidie à 45°C. Faire ensuite des mouvements circulaires et de va et vient en forme8 pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose laisser solidifier sur paillasse. Les boîtes seront incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures pour les coliformes totaux et à 44°C pendant 24 à 48 heures, en faisant une première lecture après 24 heures pour les coliformes fécaux.

**Lecture :** Après incubation ils apparaissent sous forme de colonies, de couleur rouge cerise. On retient les boîtes contenant un nombre de colonies compris entre 30 et 300. (AFNOR, 1996)

Les résultats sont exprimés en nombre de germes par « ml » ou « g » de produit selon la formule suivante :

$$X = N / V.D$$

X : nombre de germe par ml ou g de produit

N : nombre des colonies.

V : volume de l'inoculum

### 5.2.2.3. Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus* :

Il s'agit d'une bactérie commensale de la peau des animaux et de l'homme qui contamine fréquemment les aliments et peut entraîner des dégradations et des problèmes sanitaires. Leur caractère saprophyte de la peau et de la muqueuse des êtres vivants en fait des agents de contamination par manipulation. Les *Staphylococcus* appartiennent à la famille des *micrococcaceae*. Ce sont des cocci à Gram+, non sporulés, aéro-anaérobies facultatifs, immobiles, halophiles, coagulase<sup>+</sup>, protéase<sup>+</sup>, catalase<sup>+</sup>.

**Principe :** Le milieu utilisé est le milieu gélosé Baird –Parker qui contient du chlorure tellurite et une concentration en glycine pour inhiber la force secondaire. Tandis que le pyruvate et la glycine agissent comme accélérateurs sélectifs de croissance pour les staphylocoques. Dans ce milieu opaque par la suite de la teneur en jaune d'œuf, les colonies de staphylocoques présentent deux caractéristiques diagnostiques :

- Elles donnent naissance par lipolyse et protéolyse à des halos clairs caractéristiques.
- La réduction du tellurite en tellure développe une coloration noire.

**Mode opératoire :** Transférer à l'aide d'une pipette stérile, 0,1ml de la dilution décimale  $10^{-1}$ , à la surface d'une plaque de la gélose BP. Etaler soigneusement l'inoculum à la surface de la gélose en essayant de ne pas toucher les bords de la boîte avec un râteau stérile. La boîte sera incubée à 37°C pendant 48 heures.

**Lecture :** Les colonies de *Staphylococcus aureus* apparaissent sur le milieu de couleur noire, brillante, voutée avec une bordure blanche mince entourées d'un halo clair. Pour confirmer la présence de *Staphylococcus aureus* quelques tests biochimiques caractéristiques de l'espèce sont effectués. Les résultats sont exprimés en nombre de germe par « ml » ou « g » de produit. (AFNOR, 1994).

### 5.2.2.4. Recherche et dénombrement des clostridium sulfito-réducteur (CSR) :

Il s'agit de bactérie « telluriques » communément rencontrés dans le sol, les eaux des égouts et l'intestin. Elles peuvent contaminer et dégrader les produits alimentaires dans des conditions d'anaérobie (conserves). Ce sont des bactéries catalase<sup>-</sup>, réduisent le nitrate en nitrite, fermentant le lactose avec production de gaz.

**Principe :** Le milieu utilisé est la gélose viande-foie (VF), additionnée de sulfite de sodium et d'alun de fer, l'action des germes sulfito-réducteur (*Clostridium*) conduit à la réduction de sulfite de sodium en présence d'alun de fer en sulfure, donnant des colonies à coloration noire.

Ces microorganismes étant anaérobies strictes. Pour créer l'anaérobiose nécessaire à leur croissance l'ensemencement doit se faire en gélose profonde.

**Mode opératoire :** Introduire 2 à 5 ml de la suspension mère dans 2 tubes vides et stériles et également 1 ml de cette dernière qui va être complétée par la suite avec 4ml d'eau physiologique stérile.

Ces 3 tubes sont portés au bain-marie à 80°C pendant 10 minutes, afin d'éliminer les formes végétatives et de ne laisser que les spores. Les tubes sont aussi très tôt refroidis à l'eau du robinet avant de faire couler aseptiquement la gélose VF fondue et refroidie à 45°C additionner de sulfite de sodium (5ml) et d'alun de fer (2ml) les tubes sont à nouveau refroidis à l'air ambiant et incubés à 37°C pendant 72 heures.

**Lecture :** Les colonies de *Clostridium sulfito-réducteur* apparaissent de couleur noire le résultat s'exprime par le nombre de spores par « ml » ou « g » de produit.

#### 5.2.2.5. Recherche des salmonelles :

Leur recherche et leur identification permettant de savoir si le produit est dangereux à consommer ou non. Les salmonelles attaquent spécifiquement la cavité gastro-intestinale qui va provoquer une diarrhée avec douleurs abdominales. Les bactéries de genre *Salmonella* appartiennent à la famille des *Entérobacteriaceae*. (Entérobactérie pathogène) ce sont des bacilles Gram<sup>-</sup> anaérobies facultatifs, habituellement mobiles grâce à une ciliature péritriche, oxydase<sup>-</sup>, catalase<sup>+</sup>, lactose<sup>-</sup> H<sub>2</sub>S<sup>+</sup>.

**Principe :** La présence de sucre, extraits de levure et de peptone constituent la gélose Hektoen qui favorise l'isolement de bactérie de genre *Salmonella* qui sont en fait des Entérobactéries pathogènes, ce milieu est rendu sélectif par la présence des sels biliaires qui inhibent le développement du *Proteus*. Avant de procéder à l'isolement. Il faut réaliser un prés-enrichissement dans un bouillon lactosé manitolé tamponné (BLMT) puis un enrichissement sur le bouillon au sélénite acide de sodium et cystéine (SFB).

**Mode opératoire :** La recherche des salmonelles se fait en trois étapes :

- **La première étape : pré-enrichissement**

Introduire 25ml de l'échantillon à analyser dans 100 ml de milieu BLMT qui va être incubé à 37°C pendant 24 heures.

- **La deuxième étape : Enrichissement**

Prélever 1 ml de milieu de pré-enrichissement etensemencer le dans 10 ml de milieu SFB. Incuber à 37°C pendant 24 heures.

- **La troisième étape : Isolement**

A partir du milieu SFB positif,ensemencer par stries une boite de pétris contenant la gélose Hecktoen. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures.

**Lecture :** Les salmonelles se présentent sous forme de colonies de 2 à 4 mm de diamètre et de couleur bleu verdâtre avec ou sans centre noire. Les résultats sont exprimés par la présence ou l'absence de germe (**NF En ISO 6579**).

## **6. Les analyses sensorielles :**

Les tests utilisés couramment dans les laboratoires pour l'analyse sensorielle des produits alimentaires comprennent l'étude de la différence, du classement par rang de l'intensité, de l'attribution des cotes d'intensité et les analyses descriptives (**watts et al. 1991**). Les tests appliqués sur nos produits sont le test de comparaison par paire, le test de classement par rang et le test hédonique.

### **6.1. Panel**

Le panel est constitué de 30 sujets de sexes masculin et féminin ; enseignants, étudiants en graduation et en post-graduation de notre faculté de science de la nature et de la vie à Bouira.

Il leur est montré la façon dont les bulletins seront remplis, en se servant de bulletins agrandis projetés sur un écran. Nous avons évité de discuter de l'aliment qui sera soumis aux essais, en expliquant la méthode et les protocoles d'analyses utilisées, pour réduire la confusion et rendre la tâche plus facile aux dégustateurs. Il est important qu'ils comprennent bien les procédures utilisées et la façon de remplir les bulletins afin de participer aux essais sur la même base. Il faut recommander aux dégustateurs d'éviter l'utilisation de produits à

l'odeur prononcée, comme les savons, les lotions et les parfums avant de participer à un panel et d'éviter de manger, de boire ou de fumer au moins 30 minutes avant de procéder aux essais (Kehal, 2013).

### **6.2. Test de comparaison par paire :**

Le test de comparaison par paire est utilisé afin de déterminer les différences entre deux échantillons pour une propriété déterminée « l'arôme » et afin de voir s'il y a une différence entre deux échantillons pour essai (NF V 09-012, 1983).

Le principe est la présentation aux sujets d'une paire d'échantillons, l'un de ces échantillons pouvant être le témoin (NF V 09-012, 1983).

Six paires d'échantillons (AB ; AC ; AD ; BC ; BD ; CD) ont été préparées. Les échantillons de chaque paire ont été présentés aux dégustateurs dans des gobelets contenant la même quantité de produit et codés. Il est demandé aux examinateurs de remplir le bulletin préalablement établi (annexe 7) et de se rincer la bouche entre chaque paire lors de la dégustation.

- **Analyses des données**

Le nombre des réponses allant dans le sens prévu est totalisé, en se référant à la table de **Roessler, Baker et Amerine** pour analyser la signification des résultats (annexe8).

### **6.3. Test de classement par rang :**

Ce test a pour objectif de déterminer la mesure dans laquelle le consommateur accepte un produit. L'acceptation d'un produit alimentaire indique en général la consommation réelle de ce produit.

Présenter un ensemble d'échantillons et demander aux dégustateurs de classer par rang ces échantillons codés en fonction de l'acceptation en allant du plus acceptable au le moins acceptable.

Une série de quatre échantillons (le fromage fondu) a été préparée pour chaque dégustateur, dans des gobelets codés. Tous les échantillons ont été présentés simultanément à chaque dégustateur dans un ordre au hasard, et ils ont eu le droit de goûter plusieurs fois les échantillons (annexe9).

#### **6.4. Test hédonique :**

Ce test a été retenu pour évaluer d'une façon générale le degré d'appréciation des échantillons de fromage en réalisant des profils sensoriels pour chaque produit.

Demander aux dégustateurs d'évaluer des échantillons codés de plusieurs produits en indiquant leur degré d'appréciation sur une échelle à 9 niveaux, afin de réaliser des profils sensoriels.

Les quatre fromages fondus élaborées ont été présentées simultanément dans des gobelets identiques codés. Il est demandé aux dégustateurs de remplir les bulletins (**annexe 11**) en se basant sur l'analyse de la texture, de la couleur, de l'odeur, du goût et de l'arôme des produits.

## Résultats et discussion

### 1. Extraction de l'huile essentielle de l'orange

#### 1.1. Caractéristiques du fruit d'orange utilisé

Le fruit utilisé dans cette étude est l'espèce *Citrus sinensis* de couleur orange, de forme ovale et de poids moyen de  $200 \pm 3$  g.

L'écorce à une épaisseur de 2 mm son taux d'humidité est de l'ordre de  $74,3 \pm 1.15\%$ .

L'huile essentielle extraite à partir du zeste d'orange par la méthode d'hydrodistillation voir Annexe 12

#### 1.2. Cinétique d'extraction

Les résultats du suivi de la cinétique sur diagramme (figure 10) sont comme suite :

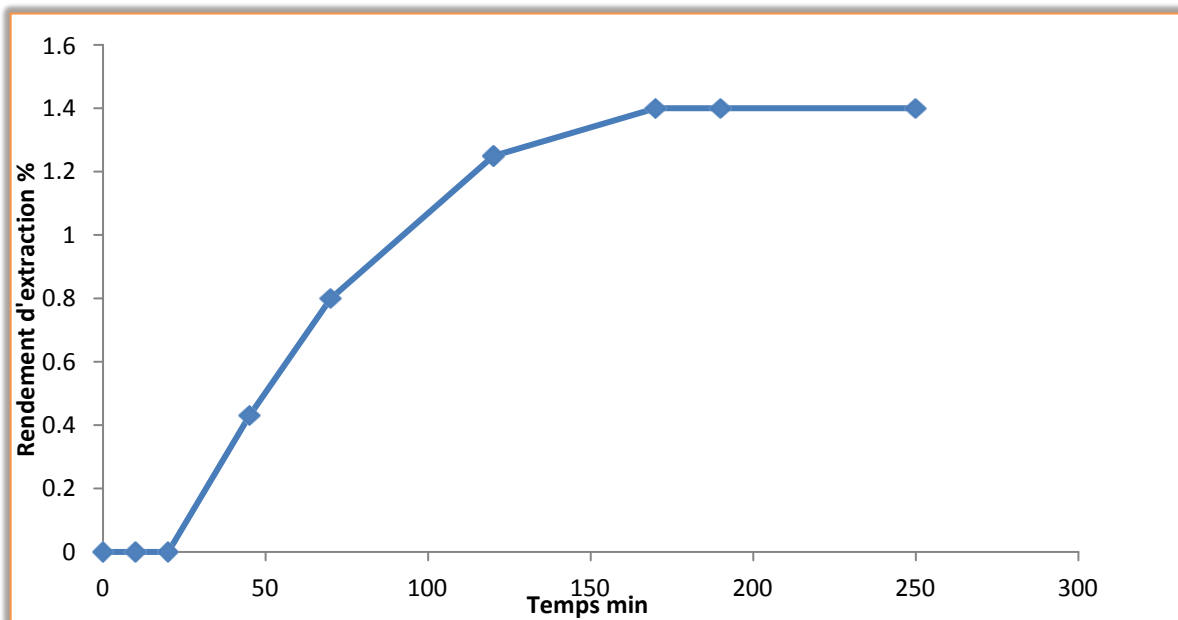


Figure 10 : Cinétique d'extraction de l'huile essentielle d'orange.



Cette étude de cinétique montre l'existence de trois étapes :

- Une première partie relative au chauffage de la matière végétale et correspondant à la montée en température au sein du réacteur qui s'étale de 0 à 20 minutes, étape durant laquelle aucune extraction d'huile essentielle ne se produit
- La seconde étape correspond à une extraction plus ou moins rapide de l'essence selon la technique d'extraction et la matrice traitée ; suite à l'éclatement intense des poches schizolysigènes. Cette augmentation s'observe dans l'intervalle de temps de 20 à 180 minutes
- Enfin, au cours de la troisième étape la courbe tend vers un second palier, qui correspond pour une matrice donnée au rendement maximum possible à être atteint dans les conditions expérimentales optimisées. S'observe au-delà de 180 minutes et se caractérise par un palier où le rendement d'extraction a atteint un taux constant de 1,4%. Cette stagnation pourrait s'expliquer par l'épuisement des cellules de l'écorce en huile essentielle. Ce résultat est cohérent avec celui obtenu par Himed (2011) où la durée d'extraction observée a été de 120 min. A l'issue de ce suivi, la durée d'extraction de cette huile a été fixée à 180 min.

### 1.3. Le rendement en huile essentielle de l'orange

Nous rappelons que l'huile essentielle a été extraite des écorces de l'orange par un hydrodistillateur. Nous avons obtenu une huile de couleur jaune pâle avec une odeur aromatique. Le rendement en huile essentielle d'orange est de 1,4%.

Ce rendement est supérieur aux rendements obtenus par **Blanco Tirado *et al.* (1995)** et **Hellal (2011)** qui valent respectivement 0,19% et 0,70 %, mais il est inférieur au rendement obtenu par **Himed (2011)** qui est de l'ordre de 2,18%.

Cette différence pourrait s'expliquer par l'effet variétal, la période de récolte, les conditions environnementales (le climat, la zone géographique, le degré de fraîcheur) et la méthode d'extraction employée. (**Bourgou *et al.*, 2012**).

Le degré de maturation du fruit influe remarquablement le rendement de l'huile essentielle. **Bourgou *et al.* (2012)** ont constaté que le rendement en HE d'orange augmente au début puis diminue vers la fin de la maturation.

D'après **Himed (2011)**, le mode d'extraction a un impact sur le rendement d'extraction des huiles essentielles. Le même auteur a constaté que, en utilisant la même variété d'orange .

**Tableau 03 : Les caractères organoleptiques de l'huile essentielle de l'orange :**

Les caractères organoleptiques des huiles essentielles	Couleur	Aspect	Odeur	Saveur
<i>Citrus sinensis</i>	Jaune très pale à transparent	Liquide limpide	Fraiche épicée	Fortement piquante
<b>AFNOR ISO 3140</b>	Jaune tres pale à transparent	Liquide limpide fluide et mobile	Fraiche épicée	Fortement piquante

## 2-Propriétés physico-chimiques

Les résultats de la détermination des paramètres physique de l'H. E d'orange, obtenu par hydrodistillation sont regroupée dans le tableau 04.

**Tableau 04 : Propriétés physiques de l'huile essentielle de l'orange**

Les indices physiques	AFNOR	Huile extraite
<b>La densité relative D<sub>20</sub></b>	0,884	0 ,869
<b>L'indice de réfraction</b>	1,461-1,470	1,462
<b>La miscibilité à l'éthanol</b>	-	1V H.E / 3 V Méth

Ces résultats ont montré que nos huiles sont conformes avec ceux de la norme AFNOR ISO 3140.

Les résultats de la détermination des propriétés chimiques de l'HE d'orange sont regroupés dans le tableau ci-dessus.

**Tableau 05 : paramètres chimiques de l'huile essentielle d'orange**

Les indices chimiques	Huile extraite
<b>Indice d'acide Ia</b>	6,10±0.65
<b>Indice d'ester Ie</b>	25 ,80±0.32
<b>Indice de saponification Is</b>	40,067±1.14
<b>Indice d'iode Ii</b>	80.26±1.02
<b>Indice de peroxyde Ip</b>	6 ,345±0.33

Nous avons répété nos expériences trois fois pour chaque calcul d'indices

Au vu des résultats obtenus, on observe que les paramètres physiques déterminés se rapprochent de ceux des normes. La valeur d'indice de réfraction de nos échantillons correspond aux normes de l'ISO (1999).

L'indice de réfraction (IR) représente aussi un critère de pureté de l'huile essentielle. Il dépend de la composition chimique des huiles essentielles et de la température. Il indique aussi la capacité des H.E à réfléchir la lumière (Hellal, 2011).

La connaissance des indices chimiques donne des indications assez précises sur l'essence étudiée, ainsi, l'indice d'iode est lié à l'état d'insaturation des chaînes carbonées des acides libres présentes dans l'HE, d'après nos résultats, notre huile essentielle présente une valeur de  $80,26 \pm 1,02$  qui est dans les normes qui sont respectivement de l'ordre de 76 et 101g d'iode / 100g d'HE ; traduit le caractère insaturé de cette huile essentielle.

L'indice d'acide indique le comportement et la quantité des acides libres présents dans notre huile. Il peut aussi renseigner sur la susceptibilité de l'huile à subir des altérations, notamment l'oxydation.

D'après notre résultat, l'huile essentielle d'orange extraite présente une valeur égale à  $6,10 \pm 0,65$  mg KOH/g d'HE : une valeur qui rentre dans l'intervalle de la norme AFNOR qui préconise des valeurs entre (4,5-6,5)

L'huile essentielle d'orange extraite à un indice d'ester de l'ordre de  $25,80 \pm 0,32$  mg de KOH/g d'HE à une température de 25°C cet indice est dans les normes AFNOR qui est de l'ordre de 22 à 28.

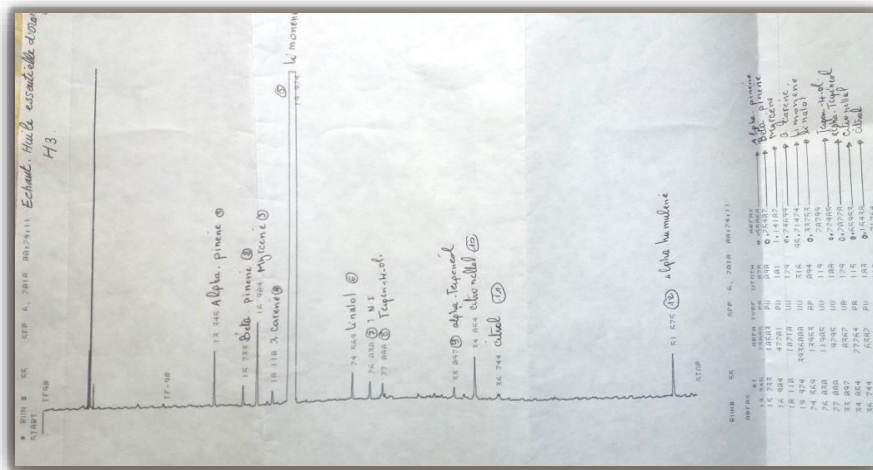
L'huile essentielle d'orange montre un indice de peroxyde de l'ordre de 6,345. Cette valeur trouve sa place dans l'intervalle des valeurs citées dans les normes. Ce résultat indique la présence d'une quantité élevée de peroxyde dans l'huile essentielle.

### 3. L'analyse chromatographique

La chromatographie sous toutes ses formes représente un moyen d'identification et de séparation très efficace fréquemment utilisée pour l'analyse qualitative et quantitative des huiles essentielles.

Cette analyse est réalisée au niveau de laboratoire de département de science alimentaire à l'INA de El-Harrach.

L'analyse chimique des huiles essentielles a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse. Les principaux composants et leurs pourcentages ont été déterminés ainsi que le temps et les indices de rétention. Les résultats d'analyse sont consignés dans le **tableau 06** et le chromatogramme est illustré dans la figure **11**.



**Figure 11** : chromatogramme de l'huile essentielle d'orange

L'analyse chromatographique de l'huile essentielle d'orange permet de identifier les composés principaux de notre huile qui sont présentes dans le tableau suivant :

**Tableau 06** : les principaux composés de l'huile essentielle d'orange.

Nom des composés	Pics N°	Tr (mn)	Pourcentage
<b><math>\alpha</math>-pinène</b>	01	13.45	0.55%
<b><math>\beta</math>-pinène</b>	02	15.73	0.25%
<b>Myrcene</b>	03	16.90	1.14%
<b>Carène</b>	04	18.11	0.24%
<b>Limonène</b>	05	19.92	95.21%
<b>Linalol</b>	06	24.56	0.33%
<b>Terpen.4-ol</b>	08	27.08	0.22%
<b>Alpha –Tepèneol</b>	09	33.09	0.20%
<b>Citronellal</b>	10	38.95	0.65%
<b>Citral</b>	11	36.74	0.15%

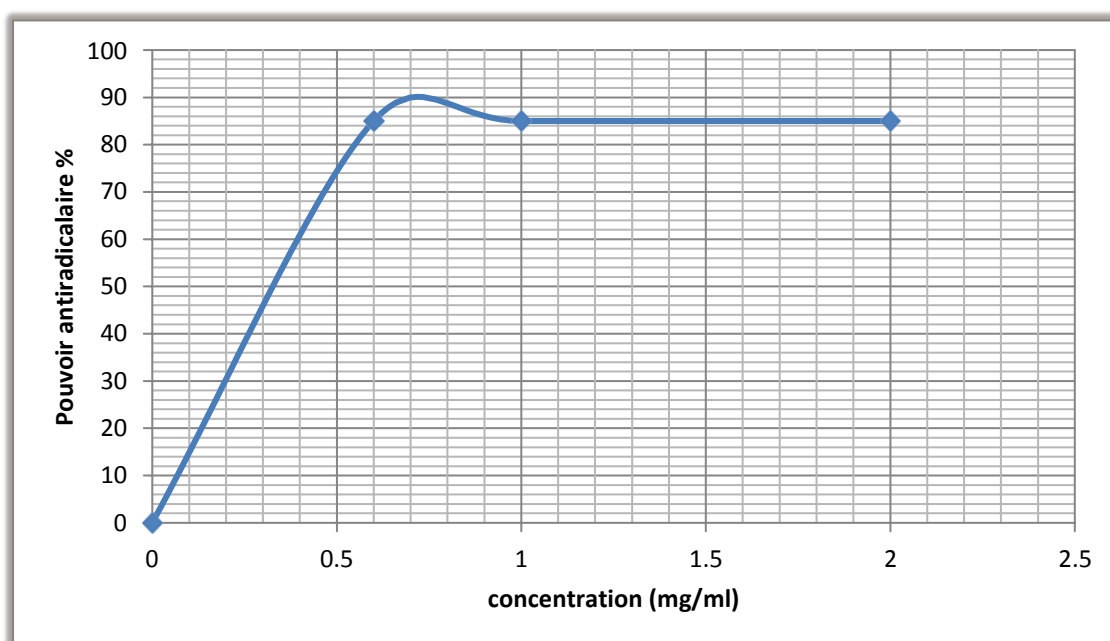
L'analyse a pu mettre en évidence la présence de 11 composants du volume totale de l'huile essentielle de l'orange.

On note la présence de composés principale le limonène par 95.21% considérer comme le produit majoritaire de l'huile d'orange

Et d'autres composés sont également présents dans cette huile, mais à des teneurs relativement faibles : 0.55% de  $\alpha$ -pinène ; 0.25% de  $\beta$ -pinène ; 1.14% de myrcene ; 0.24% de carène ; 0.33% linalol ; 0.22% Terpen.4-ol ; Alpha –Tepèneol 0.20% ; Citronellal 0,65% et de 0,15% pour le citral.

### 3- Les activités antioxydants de l'huile essentielle

Une méthode simple, rapide et largement utilisée. L'activité antioxydante des huiles essentielles de l'orange et de certains de leurs principaux constituants,  $\alpha$ -pinène et limonène se manifeste via le changement de la couleur de DPPH• entre l'état oxydée (forme violette) et l'état réduit (forme jaune), ce qui permet de quantifier le pourcentage d'inhibition de ce radical en mesurant les variations de l'absorbance aux différentes concentrations utilisées (figure 12).



**Figure 12:** pouvoir anti-radicalaire de l'huile essentielle d'orange.

D'après les résultats illustrés dans la figure on remarque que l'activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique de l'huile essentielle d'orange est assez important, il à éliminer presque la totalité des radicaux libres (90% des radicaux libres ont été piégé)

On remarque aussi que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration de l'huile.

Les résultats obtenus (figure 12), indique que le CE<sub>50</sub> de l'HE d'orange est de l'ordre de 0,31mg/ml, cette valeur est plus importante que celle de l'HE du citron qui est de l'ordre de

5,5 mg/ml et celle de la vitamine E qui est de l'ordre de 12,90 mg/ml trouvée par KEHAL 2013.

L'activité antioxydante de l'H.E testée est probablement liée aux composés majoritaires qui sont principalement le limonène (**Misharina et Samusenko, 2008**)

Selon **Tang et al. (2001)**, le  $\beta$ -pinène et le limonène présentent des propriétés antioxydantes importantes ; ils ont minimisé le taux normal d'une réaction chimique d'oxydation en piégeant le radical hydroxyle.

▸ **Teneur en composés antioxydants**

La teneur des composés antioxydants sont présentés dans le tableau n :

**Tableau 07** : la teneur de l'HE d'orange en composés antioxydants

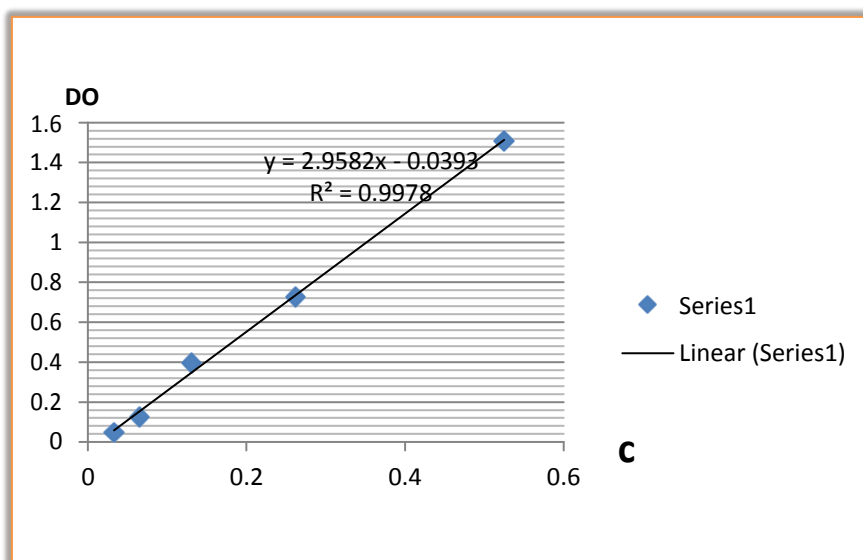
Echantillon	Polyphénols (mg eq.ac.gallique/g)	Flavonoïdes (mg eq de quercétine/ g d'huile)
L'huile essentielle de l'orange	0.27±0.106	1.17±0.78

▸ **Teneur en polyphénols totaux**

Pour la préparation de notre courbe d'étalonnage de l'acide gallique, on a utilisé les concentrations illustrées dans le tableau 08 et la courbe d'étalonnage obtenu est présentée dans la figure 13.

**Tableau 08** : préparation de courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Dilutions	SM	S/2	S/4	S/8	S/16
Concentration en ml	0,00325	0,0065	0,013	0,026	0,052



**Figure 13** : la courbe d'étalonnage des polyphénols

Les polyphénols sont des composés fortement hydroxyles que l'on retrouve dans diverses fractions d'extraits végétaux. Ils ont la capacité d'absorber les radicaux libres dans les systèmes biologiques. Ce qui fait de ces composés de potentiels agents antioxydants (Hagerman *et al.*, 1998).

L'analyse qualitative des extraits méthanoliques de l'huile essentielle d'orange a été effectuée par des méthodes colorimétriques basées sur l'utilisation du spectrophotomètre UV-visible par la méthode de Folin-Ciocalteu dont le but est l'estimation des quantités en polyphénols présentes dans notre huile.

Les résultats des dosages montrent que l'extrait méthanolique de l'H.E est à une teneur en polyphénols qui est de l'ordre de 0.27 mg eq.ac.gallique/g d'huile (Écart type = 0.106) cette valeur est supérieure à celle qui a été trouvée par HAMA et ASLOUNE 2017 qui est de l'ordre de 3.68 mg eq.ac.gallique/g d'huile

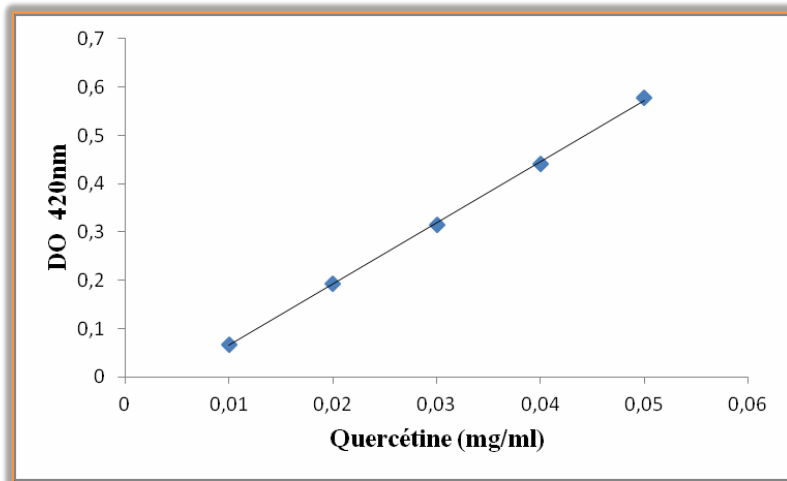
➤ **Teneur en flavonoïdes**

• **La courbe d'étalonnage des flavonoïdes**

**Tableau 09** : Préparation des dilutions de la quercétrine pour la réalisation d'une courbe standard des flavonoïdes (figure 14).

Dilutions	SM	S/2	S/4	S/8	S/16
Concentration (mg/ml)	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05



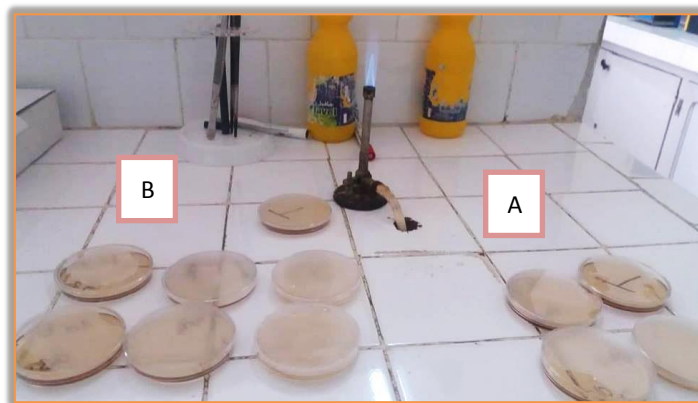


**Figure 14** : la courbe d'étalonnage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits méthanoliques de notre huile est exprimés en mg d'équivalents de Quercétine par g d'huile est de 1.17 EC/100g écart type 0.78, cette valeur est proche de celle qui été trouver par HAMA et ASLOUNE 2017 qui est de l'ordre de 1.6 mg d'équivalents de Quercétine par g d'huile.

### 5. Résultats de l'analyse microbiologique de l'huile essentielle d'orange

Les résultats des analyses microbiologiques du l'huile essentielle d'orange exprimés en UFC/ml sont représentés dans le tableau 10.



**Figure 15** : Préparation des échantillons de l'huile essentielle d'orange pour l'analyse microbiologique (A) dénombrement et recherche des levures et moisissures dans H.E d'orange/ (B) Dénombrement de FTAM

**Tableau 10** : caractéristiques microbiologiques de l’H.E d’orange

Germe	Echantillon	H.E d’orange	Normes J.O.A UFC/ml
<b>Les levures et moisissures</b>	Huile pure	Absent	—
	Solution mère		
	Témoin		
	La dilution 10 <sup>-1</sup>		
	La dilution 10 <sup>-2</sup>		
<b>les FTAM</b>	Huile pure	Absent	10 <sup>5</sup>
	Témoin		
	Solution mère		
	La dilution 10 <sup>-1</sup>		
	La dilution 10 <sup>-2</sup>		

La flore mésophile aérobie totale et un bon indicateur de contamination globale, renseigne sur la qualité hygiénique du l’huile essentielle (**GUINOT-THOMS et al, 1995**). Selon **FARRIS (2009)**, une H.E de très bonne qualité microbiologiques lorsqu’il contient moins de 10<sup>5</sup> germes /ml H.E. Cela est dû probablement à l’hygiène respectée à savoir le nettoyage des mains, le matériel d’extraction et des récipients.

Les huiles essentielles analysées sont dépourvues de levures et moisissures, donc ils sont conformes à la **norme du journal officiel de la république algérienne (1998) et GUIRAUD (1998)**.

## 6. Elaboration et analyses de fromage fondu incorporés par H.E d'orange

### 6.1. Choix des doses d'incorporation en huile essentielle

Pour choisir les doses de l'HE à incorporer dans le fromage fondu, nous avons évalué ses activités biologiques.

A la base des essais préliminaires sur les analyses sensorielles de deux fromages élaborés à des concentrations de 0.1% et de 1%, nous avons écarté toutes les concentrations qui sont supérieures à 1% à cause de l'amertume perçue à cette concentration, et inférieures à 0,1 du fait de l'absence de la perception de l'arôme d'orange.

Pour répondre aux critères sensoriels et conservateurs de l'huile essentielle, les doses de 0,1% ; 0,5% et 1% ont été choisies afin de les incorporer dans le fromage fondu. Ce qui nous a permis d'élaborer trois types de fromage fondu avec l'échantillon de référence (fromage témoin de la laiterie et fromagerie Boudouaou LFB).

#### La recette de fromage fondu de la laiterie

La préparation de fromage consiste à :

- Pesée des matières premières : les principaux ingrédients du fromage fondu fabriqué au niveau de la laiterie et fromagerie de Boudouaou sont :
    - ✓ 30 kg de cheddar
    - ✓ 30kg de fromage bloc
    - ✓ 2 kg de sel (S9 destinée à la fabrication des denrées alimentaires) et non a la vente en détail.
    - ✓ ½ de sel de table
    - ✓ 25 kg de lait en poudre
    - ✓ L'eau 42 à 50 litres
- Dans des mélangeurs à une vapeur de 85° C (**LFB**).

## 6.2. Les analyses physicochimiques

Les résultats des analyses physico chimiques du produit fini regroupés dans le tableau 11

**Tableau 11** : Les principales caractéristiques physicochimiques du produit fini étudié.

Caractéristiques physicochimiques	Témoin	0,1%	0,5%	1%	La norme
<b>pH</b>	5,82	5,85	5,85	5,94	5,60-5,85
<b>Matière grasse (g/l)</b>	16g/l	15.5 g/l	16g/l	15g/l	16g/l
<b>Extrait sec totale (g/l)</b>	40%	43,26%	45,97%	48,86%	40%

Les résultats correspondent au pH du produit fini. Il est de 5,85 pour les taux de 0.1% et 0.5% ce qui répond aux normes alors qu'il est un peu élevé dans le taux de 1% (5,94) cette petite augmentation liée à l'huile essentielle présent dans notre produit ;

Le taux de matière grasse est varié entre 15-16 g/l cette valeur est conforme à la norme

L'extrait sec total il est de l'ordre de 43.26 % pour le 0.1%, de 45.94% pour le 0.5% et 48.86% pour le 1%, cette petite différence est due probablement à l'ajout d'huile essentielle Le taux de la matière grasse et de l'extrait sec est très important dans la fabrication du fromage car les lipides du lait se caractérisent par la présence des acides gras a chaine relativement courte qui peuvent être absorbés par un mécanisme plus simple que celui des acides gras a chaine longue

La matière grasse du lait joue un rôle essentiel dans le développement du gout mais aussi de la texture du fromage. (ANONYME, 2013).

### 6.3. Caractéristiques microbiologiques

Les résultats des analyses microbiologiques du notre produit fini exprimes en UFC/ml sont représentés dans le tableau 12.

Tous les résultats obtenus sont conformes aux normes de la directive du control officiel (**DQ/SVHA/N83 n8088 du 21 Juillet 1983**). On peut noter que nos produits sont de qualité satisfaisante et conformément aux exigences des consommateurs.

**Tableau 12** : Résultats d’analyse microbiologiques de produit fini

Germe	Les échantillons				Normes J.O.A UFC/ml
	Témoin	0.1%	0.5%	1%	
<b>Coliformes totaux</b>	0	0	0	0	2. 10 <sup>6</sup>
<b>Coliformes fécaux</b>	0	0	0	0	10 <sup>3</sup>
<b>Staphylococcus aureus</b>	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent
<b>Clostridium sulfito- réducteur</b>	0	0	0	0	<50
<b>Salmonelles</b>	Absent	Absent	Absent	Absent	Absent

#### 7.3.1. Les coliformes totaux et fécaux

L’analyse microbiologique ne révèle qu’aucune contamination des échantillons en coliformes totaux et fécaux. **Selon LARPENT (1990)**, la présence des coliformes totaux n’est pas obligatoirement une indication directe de la contamination fécale.

La présence des coliformes fécaux est considérée comme un indice de contamination fécale, il s’agit plutôt de marqueurs de mauvaise maitrise d’hygiène ainsi qu’a la mauvaise manipulation (**GUIRAUD et ROSEC, 2004**).

Donc en peut dire que nous avons respecté toutes les conditions de manipulation et de sécurité hygiéniques durant le travail.

#### 7.3.1. Les *Staphylococcus aureus*

Pour les *Staphylococcus aureus* nous constatons l’absence totale de ce germe dans le fromage analysé. Selon **BELARBI (2015)**, la bonne conduite d’hygiène au moment de la production rend notre produit exempt de *Staphylococcus aureus*.

### **7.3.2. Les *Salmonella***

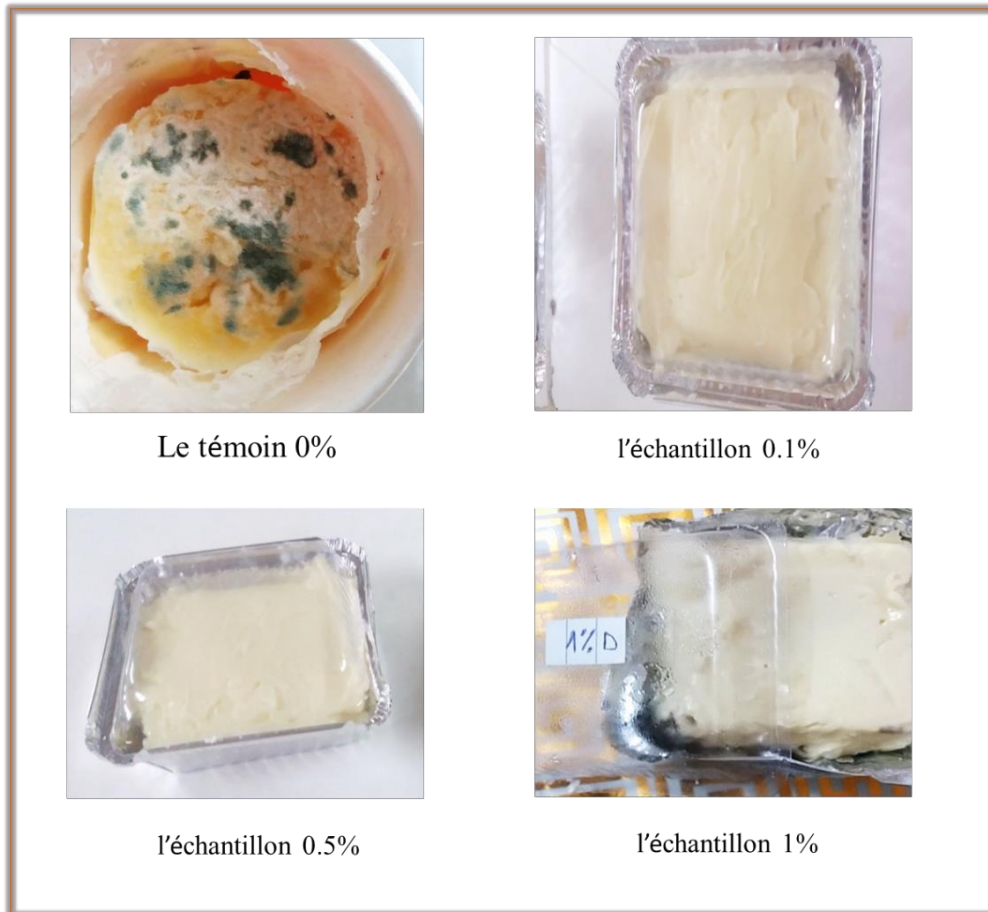
Les résultats de la recherche de *Salmonella* indiquent leur absence dans le fromage analysé. Notre résultat concorde avec celui de BELARBI (2015), SRAIRI et HAMAMA (2006), AFIF et al, (2008) et MARCO et NDIAYE (1991). L'absence de Salmonelle est un bon indice de l'état sanitaire satisfaisant de matériel de travail.

### **7.3.3. Les *Clostridium sulfito-reducteurs***

Le fromage analysé est dépourvu de *Clostridium sulfito-reducteur*, donc il est conforme à la norme du journal officiel de la république algérienne (1998) et GUIRAUD (1998).

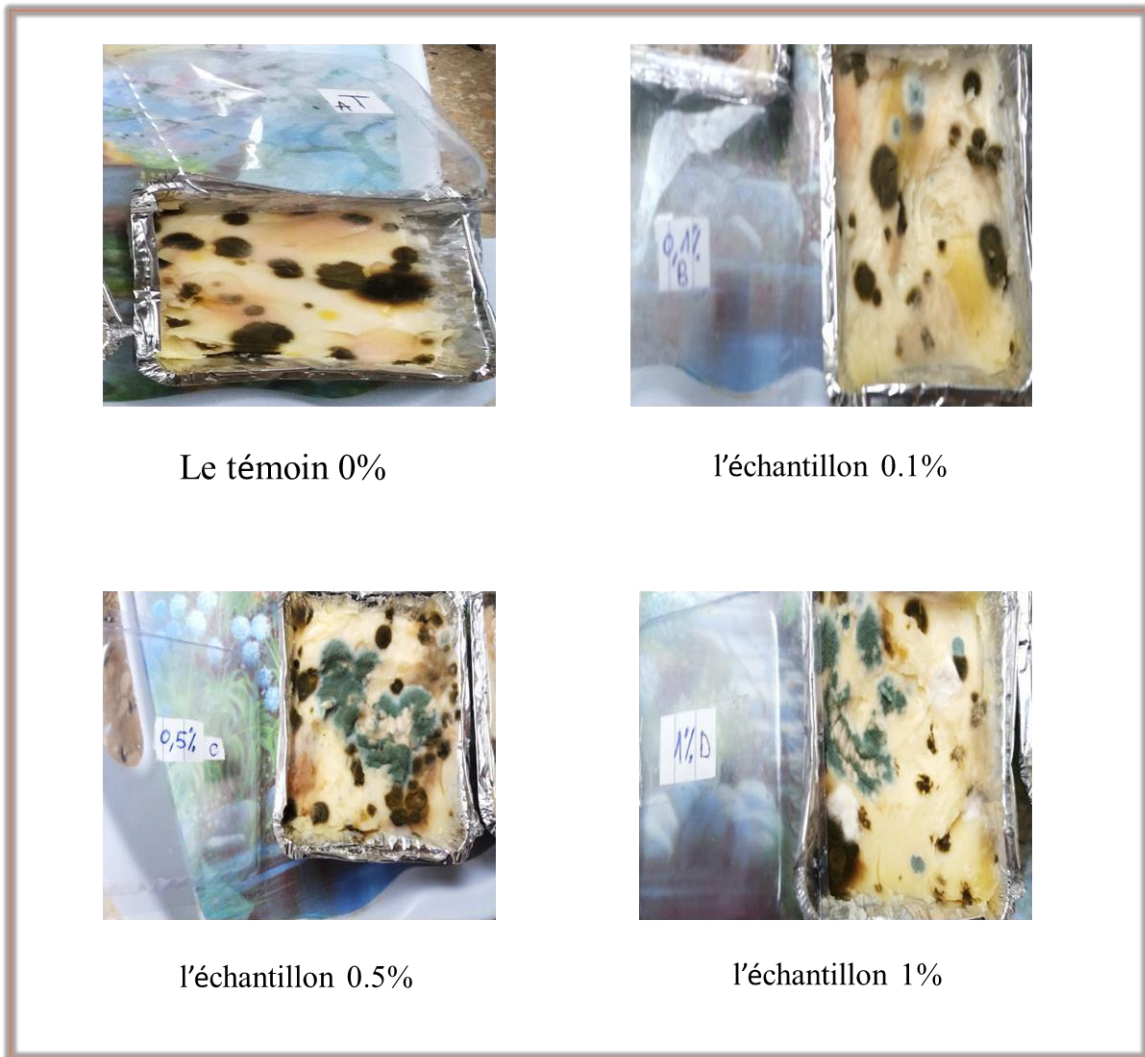
### 7.3.1. Suivi de l'évolution de la qualité microbiologique de fromage élaboré en fonction de temps

Le suivi de la qualité hygiénique de notre produit est effectué visuellement voir les figures après 5 jrs :



**Figure 16 :** les Quatre échantillons de fromage fondu après Cinq jours de leur préparation.

Après 10 jrs :



**Figure 17** : les quatre échantillons de fromages fondus après 15 jours de leurs préparations.

On remarque un développement de germe d'après les 10 jrs durant la durée de stockage ce qui traduit par la capacité de l'huile essentielle d'orange à prolonger la date limite de consommation de notre fromage.

L'huile essentielle d'orange a pu jouer le rôle d'un conservateur dans le fromage fondu à des concentrations de 1%, et elle a pu prolonger la date de consommation du fromage à sept et dix jours respectivement.

La date limite du témoin étant de quatre jours seulement.



En effet CONNER (1993), a montré que les huiles essentielles d'orange révèlent une forte capacité inhibitrice contre divers microorganismes pathogènes et d'altération dans différents aliments.

Les huiles essentielles d'orange sont également capables d'inhiber la croissance de bactéries résistantes comme : *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella entereditis* et *Staphylococcus aureus* (SHINET et al. 2005).

## 6.4. Les analyses sensorielles

### 7.4.1. Test de comparaison par paire

Les résultats du test de comparaison par paire sont consignés dans le tableau 13 au moyen du tableau statistique de l'annexe, la valeur critique était de 17. Pour le test de différence, tous les membres du panel ont pu détecter la différence significative (nombre de réponses juste =  $21 > 17$ ) entre les six paires d'échantillons des fromages et cela indique que l'incorporation de l'HE à des concentrations différentes (A = 0 %, B = 0,1 %, C = 0,5 % et D = 1%) a permis de donner des produits significativement différents.

Le seuil d'aromatisation a été analysé et les résultats obtenus montrent que seules les paires (A-B), (A-C), (A-D) présentent une différence significative d'aromatisation le nombre de détection de différence d'aromatisation = 21 en indiquant que chaque ajout de l'HE induit une perception d'aromatisation par rapport au témoin même à faible concentration (0,1%). Quant aux deux autres préparations (le 0.1% et 0.5%), la détection de la différence d'aromatisation n'a pas été significative et le degré d'aromatisation a été perçu indifféremment. Par contre pour le 1% qui leur a paru plus aromatiser et un petit peu amer.

**Tableau 13** : Résultats du test de comparaison par paire

Paire	Réponse juste ; différence	Produit aromatisé	Produit préféré
A-B	21	21	12A-9B
A-C	21	21	18A-3C
A-D	21	21	19A-2D
B-C	21	18	16B-5C
C-D	21	11	19C-2D
B-D	21	19	20B-1D
Valeur critique	17	17	17
Conclusion	il y a une différence significative pour les six paires	il y a une différence significative pour les 3 premières paires	Il y'a une différence entre les 6 paires

#### 7.4.2. Test de classement par rang

Nous avons demandé aux dégustateurs de classer les quatre préparations de fromage élaborées (A = 0 %, B = 0,1%, C = 0,5 % et D = 1 %) en termes d'acceptabilité sans donner d'égalité, en donnant à chaque échantillon une cote différente même s'ils semblaient comparables.

L'échantillon auquel on accordait le goût le plus acceptable se voyait donner la cote 1, le suivant la cote 2 et celui qui paraissait le moins acceptable la cote 3 et le dernier la cote 4. Les cotes de classement données à chaque échantillon par les 21 dégustateurs ont été récapitulées dans le tableau ci-dessus.

**Tableau 14 :** Résultats du test de classement par rang des fromages élaborés

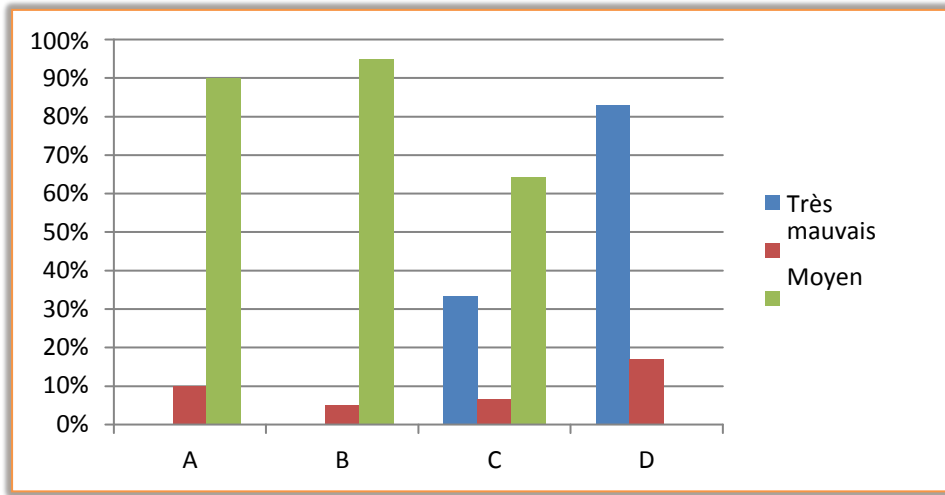
Dégustateur	A	B	C	D
1	1	2	3	4
2	1	2	3	4
3	2	1	3	4
4	1	2	3	4
5	2	1	3	4
6	3	1	2	4
7	3	1	2	4
8	4	1	3	2
9	2	1	4	3
10	2	1	3	4
11	1	2	4	3
12	3	1	2	4
13	1	2	3	4
14	2	1	4	3
15	4	1	2	3
16	3	2	1	4
17	2	1	4	3
18	1	2	3	4
19	1	2	4	3
20	2	3	1	4
21	1	3	2	4
<b>Totaux des classement</b>	42	33	59	76
<b>Valeur critique</b>	22			

La valeur critique, calculée pour 21 dégustateurs et 4 échantillons au seuil  $p \leq 0,05$ , est de 22 d'après le tableau de l'annexe 08.

La concentration de 1% en HE a donné un produit significativement déclassé par rapport au témoin.

La concentration de 0.1% est la plus acceptable par rapport aux autres concentrations et aussi par rapport au témoin avec une différence de 9 dégustateurs.

Les dégustateurs ont classé les quatre préparations de fromage par ordre de préférence selon l'intensité du goût en attribuant le premier rang au(B), suivi par Le témoin A en deuxième rang et la concentration C (0.5%) en troisième rang. Et enfin le fromage fondu le plus aromatisée (D) à 1% se voyait en quatrième rang.



**Figure 18 :** le classement des échantillons par rang selon les dégustateurs

### 7.4.3. Test hédonique

Les figures rassemblent les profils sensoriels des quatre échantillons de fromages préparées à différentes concentrations de l'huile essentielle d'oranges (A : témoin 0 %, B : 0,1 %, C : 0,5 %, D : 1%) avec différentes étapes qu'ils sont :

- ✓ La texture
- ✓ L'odeur
- ✓ Le goût
- ✓ L'arôme

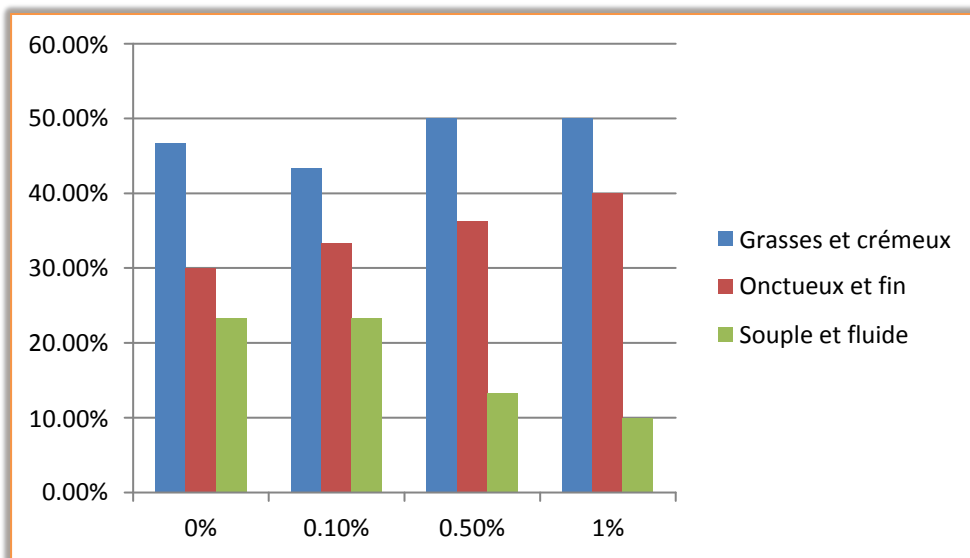
Nous constatons que les membres du panel de dégustation perçoivent que les caractéristiques sensorielles décrivant l'arôme et l'odeur d'orange ont été plus intenses dans tous les fromages contenant l'huile essentielle d'orange. Et une petite différence remarquable a été soulignée pour les autres attributs.

**La texture**

Les résultats d’appréciation de la texture de nos quatre échantillons se présentent sous formes de pourcentage dans le tableau 15.

**Tableau 15** : les résultats de test hédonique de fromage fondu sur la texture

Paramètres sensoriels	Appréciation Le code d'échantillon	Grasses et crémeux	Onctueux et fin	Souple et fluide
<b>la texture</b>	<b>0%</b>	46.66%	30%	23.33%
	<b>0.1%</b>	43.33%	33.33%	23.33%
	<b>0.5%</b>	50%	36.33%	13.33%
	<b>1%</b>	50%	40%	10%



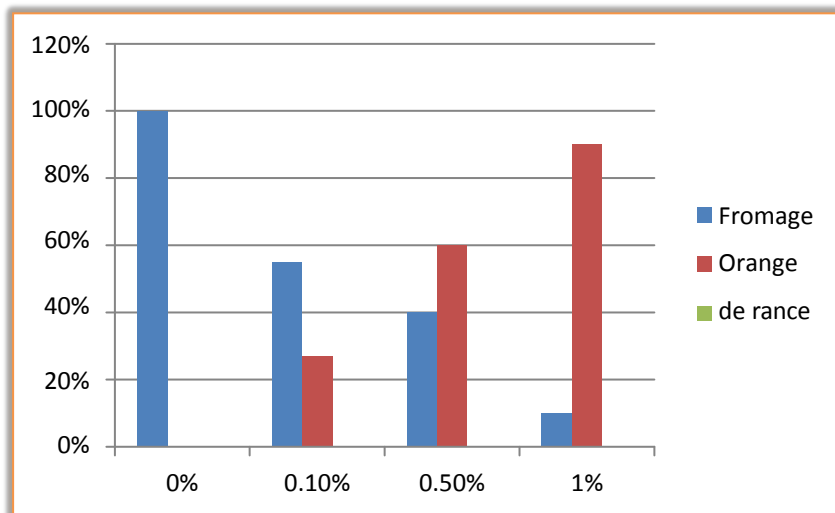
**Figure 19**: les résultats de l’appréciation des produits selon la texture.

**L'odeur et l'arôme**

Les résultats d'appréciation de l'odeur et de l'arôme de nos quatre échantillon (0% le témoin, 0.1%, 0.5% et le 1%) sont présentés sous formes de pourcentage dans le tableau 16

**Tableau 16** : les résultats de l'appréciation de l'odeur de nos fromages par les dégustateurs

Paramètres sensoriels	Appréciation Le code d'échantillon	Fromage	Orange	De rance
L'odeur et l'arôme	0%	100%	0%	0%
	0.1%	55%	45%	0%
	0.5%	40%	60%	0%
	1%	10%	90%	0%



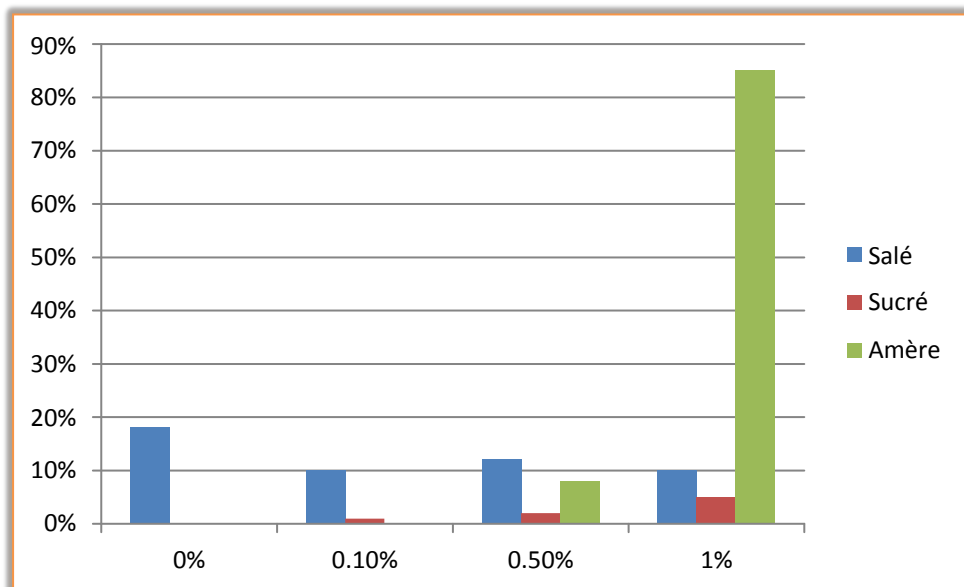
**Figure 20**: les résultats de l'odeur et l'arôme de nos échantillons.

**Le goût**

Les résultats d'appréciation de goût de nos quatre échantillon (0% le témoin, 0.1%, 0.5% et le 1%) sont présentés sous formes de pourcentage dans le tableau 17.

**Tableau 17** : les résultats de l’appréciation de gout de nos échantillons.

Paramètres sensoriels	Appréciation	Salé	Sucré	Amère
	Le code d'échantillon			
Le goût	0%	18%	0%	0%
	0.1%	10%	1%	0%
	0.5%	12%	2%	8%
	1%	10%	5%	85%



**Figure 21** : les résultats de gout de nos échantillons.

Ces résultats permettent de conclure que les taux d’incorporation de l’HE choisis dans le fromage fondu, modifient l’arôme et l’odeur, sans toucher aux caractéristiques de la texture et de la couleur.

Le degré d’acceptabilité de ces fromages avec de l’HE d’orange auprès des dégustateurs est maintenu, et cela du fait qu’il n’y avait une différence significative pendant le classement des quatre fromages fondus étudiées.

## Conclusion

En raison de l'utilisation de l'huile essentielle d'orange en technologie agroalimentaire cette étude visait l'incorporation de l'huile essentielle d'orange, dans un produit laitier le fromage fondu pour évaluer son effet antibactérien, antioxydant, conservateur et aromatique.

Au cours de cette étude, nous avons pu dégager les conclusions suivantes :

L'extraction de l'huile essentielle d'orange obtenu par hydrodistillation au laboratoire des analyses au sein de faculté SNV avec un rendement de 1.4%.

Les propriétés physicochimiques telles que les propriétés organoleptiques, le pH, la densité, l'indice de réfraction et la miscibilité à l'éthanol et les indices chimiques sont conformes aux normes AFNOR.

L'évaluation de l'activité antioxydant de l'huile essentielle d'orange par les méthodes de réduction du DPPH° et la quantification de polyphénols, flavonoïdes et quelques composés CPG/SM, a montré que cette huile essentielle possède un pouvoir antioxydant important, et une teneur en polyphénole, flavonoïdes et limonène de l'ordre 0.27mg eq.ac.gallique/g, 1.17 mg de quercétine /g d'huile et 95.21% respectivement, et donc son emploi dans le fromage peut constituer un moyen possible de prévention de l'oxydation et de protection de notre fromage.

La microbiologie de l'huile essentielle d'orange a montré que notre huile extraite est dépourvue des FTAM et des levures et moisissures ce qui nous permet de l'incorporer dans le fromage fondu à des différentes concentrations (0.1%,0.5% et 1%).

Nous n'avons pas pu appliquer des doses élevées de l'huile essentielle dans le fromage fondu (> 1%), puisqu'elles affectent les propriétés organoleptiques en donnant un goût amer au produit.

Les résultats des analyses physico-chimiques et microbiologiques des fromages fondus élaborés, sont conformes aux normes et le suivi visuel de la qualité hygiénique montre que la présence de l'huile essentielle aux différentes concentrations peut prolonger leur durée de conservation jusqu'à 10jrs.

Les résultats des analyses sensorielles montrent que l'incorporation de l'huile essentielle dans le fromage fondu, pour des concentrations de 0,1% et 0,5%, n'entraîne aucune différence



significative de point de vue aromatisation, et donnent des produits classés indifféremment avec le témoin. Seul le taux d'incorporation de l'huile essentielle de 1% a déclassé significativement le produit par rapport au témoin en quatrième rang, les dégustateurs préfèrent le produit qui contient une concentration de 0.1% et le classe en premier rang.

Même si ce travail a permis d'étudier les caractéristiques biologiques de l'huile essentielle de l'orange et d'explorer la possibilité de son utilisation comme agent conservateur et aromatique dans le fromage fondu, beaucoup de questions mériteraient d'être traitées, donc il est souhaitable :

- D'évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'orange par l'isolement des souches bactérienne.
- Evaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle d'orange par le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène.

## Références

**Adams RP. (2001).** Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured: Carol Stream, IL.

**AFNOR. (2000).** Association française de normalisation. Normes françaises : huiles essentielles. AFNOR, Paris.

**AMADOU.H et SAID A .S. (2002).** Contribution à l'étude de stabilité de fromage fondu stérilisé : aspect physico-chimiques. Mémoire diplôme d'étude universitaire appliqué (DAEA). Université M'HAMED BOUGARA BOUMERDES. Algérie. P 9-28

**Amazal. (2010).** Etude de l'activité antioxydante des saponines du tourteau de

**Anonyme. (2014).** Les huiles essentielles, une utilisation millénaire. [en ligne] : <http://tpehuilesessentiellesetsante.e-monsite.com/pages/i-les-huiles-essentielles-une-utilisation-millenaire/definition/b-les-differentes-techniques-d-extraction-des-huiles-essentielles.html>

**Aprotosoiaie A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F., Dorneanu V., Stanescu U. (2010).** The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *FARMACIA*, 58 (1). pp. 46-54

**Aprotosoiaie A.C., Spac A.D., Hancianu M., Miron A., Tanasescu V.F., Dorneanu V., Stanescu U. (2010).** The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *FARMACIA*, 58 (1). pp. 46-54

**Arpino P, Prévôt A, Serpinet J, Tranchant J, Vergnol A, Wittier P. (1995).** Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Masson, Paris.

**Baser K.H.C. et Buchbauer G. (2010).** Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications. Ed. *Taylor and Francis Group, LLC*. United States of America. 994p.

**Berger . (1989).** La fabrication du fromage fondu. Edition BK Ladenburg, 223p.

**Bernard T., Perinau F., Brav O., Delmas M., Gaset A. (1988).** Extraction des huiles essentielles. Chimie et technologie. In *Information chimie*, 229 pp. 179-184.

**Bouix M. et Leveau J.Y. (1984).** *Contrôle Microbiologique, biotechnologie*. Ed : Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 469 p.

**Bousbia Nabil. (2004).** Extraction et identification de quelques huiles essentielles (Nigelle, Coriandre, Origan, Thym, Romarin). Etude de leurs activités antimicrobiennes. Mémoire de magistère. Institut National Agronomique, El Harrach – Alger. 130 p.

**Boutonnier JL. (2002).** La fabrication de fromage fondu. Technique d'ingénieur, p2,3,11.

**Brule G., Lenoir J., et Ramet J.P. (1997).** Les mécanismes généraux de transformation du lait en fromage, chapitre I, la micelle de caseine et la coagulation.

**Brule, G., Lenoir., J. et Remeuf. (1997).** La micelle de caseine et la coagulation du lait dans le fromage. Ed., Eck A., *3ème édition Tec et DOC Lavoisier, Paris*, 7- 41p.

**Bruneton J. (1993).** Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, pp. 91

**Bruneton J. (1999).** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Ed. Lavoisier, 2ème Ed. Tec & Doc. Lavoisier, Paris. 623p.

**Caccioni D. R. L., Guizzardi M., Biondi D. M., Agatino R., Ruberto, G. (1998).** Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *International Journal of Food Microbiology*, 43(1e2), pp. 73-79.

**Cicile J.C. (2002)** .Distillation. Absorption Etude pratique. Techniques de l'ingénieur J 2610 pp 1-20.

**Codex Standard 283. (1978).** Norme générale pour le fromage. Lait et produit laitière, 2<sup>ém</sup> édition.pl.

**Collomb M., Spahni M.(1996).** Revue de méthodes de dosage des produits d'oxydation des lipides, principalement des lipides des produits laitiers. *Schweiz. Milch. Forschung*, 25 (1/2), pp. 3-24.

**Conner D. E. (1993).** Naturally occurring compounds. *In* Davidson P. M. ; Branen A. L. *Antimicrobials in foods*, 2nd Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. pp. 441-468.

**Dupuy A. (2010).** Stabilisation de l'interface liquide-liquide dans un contacteur membranaire : Application à l'extraction sélective de terpènes oxygénés d'huiles essentielles d'agrumes. Thèse de doctorat. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech).France. 305 p.

**Eck. (1987).** Le fromage 2<sup>em</sup>édition, technique et documentation Lavoisier. Paris. Page 227...539.

**Ecolab. (2018).** FABRICATION DE FROMAGE. [en ligne] : <https://fr.fr.ecolab.com/about/industries-we-serve/food-and-beverage-processing/cheese-processing>

**Eden. (2013).** ORANGER, CITRUS SINENSIS. [en ligne] : <https://www.moneden.fr/article/oranger-citrus-sinensis#fArt2>

**Ferhat M.A., Meklati B.Y., Chemat F. (2010).** *Citrus d'Algérie : les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions* .Ed. Office des publications universitaires, Alger. 157 p.

**Fillatre Y. (2011).** Produits phytosanitaires : Développement d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem. *Thèse de doctorat* (volume 1), université d'Angers, France. 266 p.

**Fox, P.F., et Mc Sweeney, P.L.H.( 2004).** Cheese an overview. In *Cheese:Chemistry Physics andMicrobiology*, general aspects, third edition. 1: 1 -8p.  
**Fragrance. 2011.** [en ligne] : <http://parfums-tpe.kazeo.com/de-l-athenol-a-l-anis-etoile-a122477318>

**Fredot, E. (2006).** Connaissance des alimets. Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique (éd.Tec.Et doc) Lavoisier, paris .Pp59-87

**Gaucheron F.( 2004)** .Minéraux et produits laitiers ,édition Tec et Doc, Lavoisier.P566,581,582

**Gerard .D. (2001).** Lait nutrition et santé, technique et documentation Lavoisier page 20

**Gerrit Smit. (2003).** Daily processing Improving quality , CRC press ,USA,p22

**Goris A. (1967).** *Manuel de botanique*. Ed. Clin. pp. 265-268

**Grysole J. (2005).** La commercialisation des huiles essentielles in *Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation – Manuel pratique* : Chapitre 07. Corporation LASEVE (laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales), Québec, pp.139-162

**Hammer K. A., Carson C. F., Riley T. V. (1999).** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86,(6), pp. 985-990.

**Hammer K. A., Carson C. F., Riley T. V. (1999).** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86,(6), pp. 985-990

**Hellal Z. (2011).** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des *Citrus*. : Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de magistère, Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. 78 p.

**Hemwimon S., Pavasant P., Shotiprux A. (2007).** Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda Citrifolia*. *Separation and Purification Technology*, 54, pp. 44-50.

**Himed L. (2011).** Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Citrus limon* : application à la margarine. Mémoire de magistère, Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires I.N.A.T.A.A. Université Mentouri – Constantine. 65 p.

**Holley R.A., Patel, D. (2005).** Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiol.* 22(4) pp. 273–292.

**Jeantet, R. Croguennec, Schuck, P. et Brule, G. (2006).** Science des aliments. *Volume 2, Technologies des produits alimentaires, Tec & Doc, Lavoisier, Paris.* 456p

**Kaufmann B., et Christen P. (2002).** Recent extraction techniques for natural products: Microwaveassisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochem. Anal.*, 13, pp.105-113. l'arganier. These de doctorat. Universite de Rabat, 67.

**Lesley B. (1996).** *Plantes médicinales et aromatiques.* Ed. Lavoisier. Paris. pp. 58-61.

**Lianga YZ, Xieb P, Chan K. (2004).** Quality control of herbal medicines. *J Chromatogr B*, **812**: 53-70.

**Lucchesi M. (2005)** . Exraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. *Thèse de doctorat* en Sciences, discipline: Chimie. Université de la Réunion, Faculté des Sciences et Technologies.143p.

**Luquet .(1985).** Lait et produits laitiers .vache ,brebis, chèvre , tome 3. Lavoisier .paris. Page 290-300.

**Mabberley D.J. (2008).** Mabberley's plant-book. A portable dictionary of plants, their classifications and uses, third edition. Cambridge University Press. 1040 p.

**M. MEHMET AK .,2003.**Cheeserheology and texture ,CRC PRESS, USA,Pp145-23

**Mahaut M ,Romain et Gerard b.(2000).** Initiation à la technologie fromagère , Edition Tec et Doc, Lavoisier.P173

**Mahaut M. Jeantet R., Schuck P. et Brute G. (2000).** *Les produits d'industriels laitiers.* Ed. tec et doc,Lavoisier, Paris. 187p.

**Maria Saarila . (2007).** Functional dairy products, CRC press,England, Vol. 2, p418

**Martinez Tome., M. Jimenez., A. Ruggieri., S. Frega., N. Stabbiolir, and Murcia, Molins.(1991)** .Minéraux et fromage fondu in minéraux et produits laitiers de Frédéric Caucheron 2004.

**Moll M .(1998)** . Additifs alimentaires et auxiliaires technologique. Ed. Dunod. Paris. pp. 89-99.

**Moreira M. R., Ponce A. G., del ValleC. E., Roura,S. I. (2005).** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT e Food Science and Technology*, 38(5), pp. 565-570

**NA 5936. (1993).** Norme générale pour le fromage fondu et le fromage fondu pour tartine .27 janvier , IANOR. Norme algérienne.

**Padrini F., Lucheroni M. T. (1996).** Le grand livre des huiles essentielles - guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et L'aromassage Energetiques avec Plus de 100 Photographies. Ed. De Vecchi , Paris, pp.11, 15, 61 et 111.

**Pingot A. (1998).** Les huiles essentielles. Ed : Tec & Doc. Lavoisier, Paris. pp. 230- 236

**Piochon M. (2008).** Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore aurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémisynthèse. *Thèse de doctorat.* Université du Québec, pp. 5-9



**Prior E. (2003).** Usage des corps gras alimentaires dans les différents secteurs de la technologie alimentaire. In : Graille J, ed. Lipides et corps gras alimentaires, pp. 87-147

**Ramesh C., Chandan Arum Kilara .(2011) .** Dairy Ingrédients for food processing Wiley –Blackwelle,USA,Pp255-226

**Robert A. et Lobstein A. (2005).** *Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles.* Ed : Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 522 p.

**Roux D.(2008).** *Conseil en aromathérapie.* 2ème Ed. Pro-Officina., 187 p.

**Senatore F, Arnold NA, Piozzi F. (2004).** Chemical composition of the essential oil of *Salvia multicaulis* Vahl. var. *simplicifolia* Boiss. growing wild in Lebanon *J Chromatogr A.* **1052** :237-240.

**Shu G.J., Dianxiang Z. et Mabberley D.J.(2008 ).** Citrus Linnaeus, Sp. PI. 2 : 782

**ST-Gelais D. Tiarard-Coller p. Bélanger G. Couture R. et Drapeau R. (2002).** Fromage. In : Science et technologie du lait : transformation du lait (Vignola C.L.). *Presses. Int Polytechnique.* 349-407p.

**Stangler Herodez S., Hadolin M., Skerget M., et Knez Z.(1971).** Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chem.,* Vol. 80, pp : 275 - 282.

**Tanaka .(1979) .**Le fromage in Frédéric Gaucheron 2004 Minéraux et produits laitiers, édition Tec et Doc ,Lavoisier .P570

**Vignola C.( 2002).** Sciences et technologies du lait, transformation de lait. *Ecole Polytechnique de Montréal,* 599p.

**Webmaster. (2013).** La fabrication des différentes variétés de fromage. [en ligne] :<http://lalettreatable.org/spip.php?article60> 1753. Fl. China, Vol. 11, pp : 90 – 96.

## Annexe n°1

**Tableau :** Classification des différents types de fromages et micro-organisme utilisées dans leurs fabrications.

Type de fromage	Description	Micro-organismes utilisés	Références
Fromages à pâte Fraîche	Fromages peu égouttés qui n'ont pas été affinés il y a juste coagulation des protéines du lait sous l'effet des ferments lactiques (acidification).	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactococcus lactis cremoiis</i> , <i>Lactococcus lactis diactylactis</i> .	<b>Cliamba et Irlenger, 2004</b>
Fromages à pâte Ferme	Constitues d'une pâte compacte, renfermant un peu moins d'eau que les fromages frais, mais contenant plus de sels minéraux dont les sels de calcium notamment. Dans cette catégorie, on distingue : - les fromages à pâte ferme non cuite (Edam, Saint-Paulin, etc.) - les fromages à pâte ferme cuite (Gravere. Conti. etc.)	<i>Lactococcus lactis cremoiis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , levures, moisissures diverses.	Pareute et <b>Cognn. 2004</b> <b>Yildiz. 2010</b>
Fromages à pâte molle	Fromages ayant subi un affinage relativement prolongé (protéolyse et lipolyse intenses par la flore de surface) après une fermentation lactique <b>(ex. Camembert)</b>	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactococcus lactis cremoiis</i> , <i>Streptococcus tiiif mophilus</i> , <i>Brevibacterium linens</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Penicillium camemberts</i> , levures	<b>Brauger, 2012</b> <b>Yildiz. 2010</b>
Fromages à pâte persillée	Fromages affinés, a moisissures interne (es. Roquefort). Il y a développement interne de <i>Penicillium roqueforti</i> grâce a l'action de <i>leuconostoc</i> et des levures qui produisent une ouverture et une petite quantité	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactococcus lactis cremosis</i> , <i>Streptococcus tiiier mophilus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Penicillium roqueforti</i> , levures.	Settainu et Mosclietth 2010

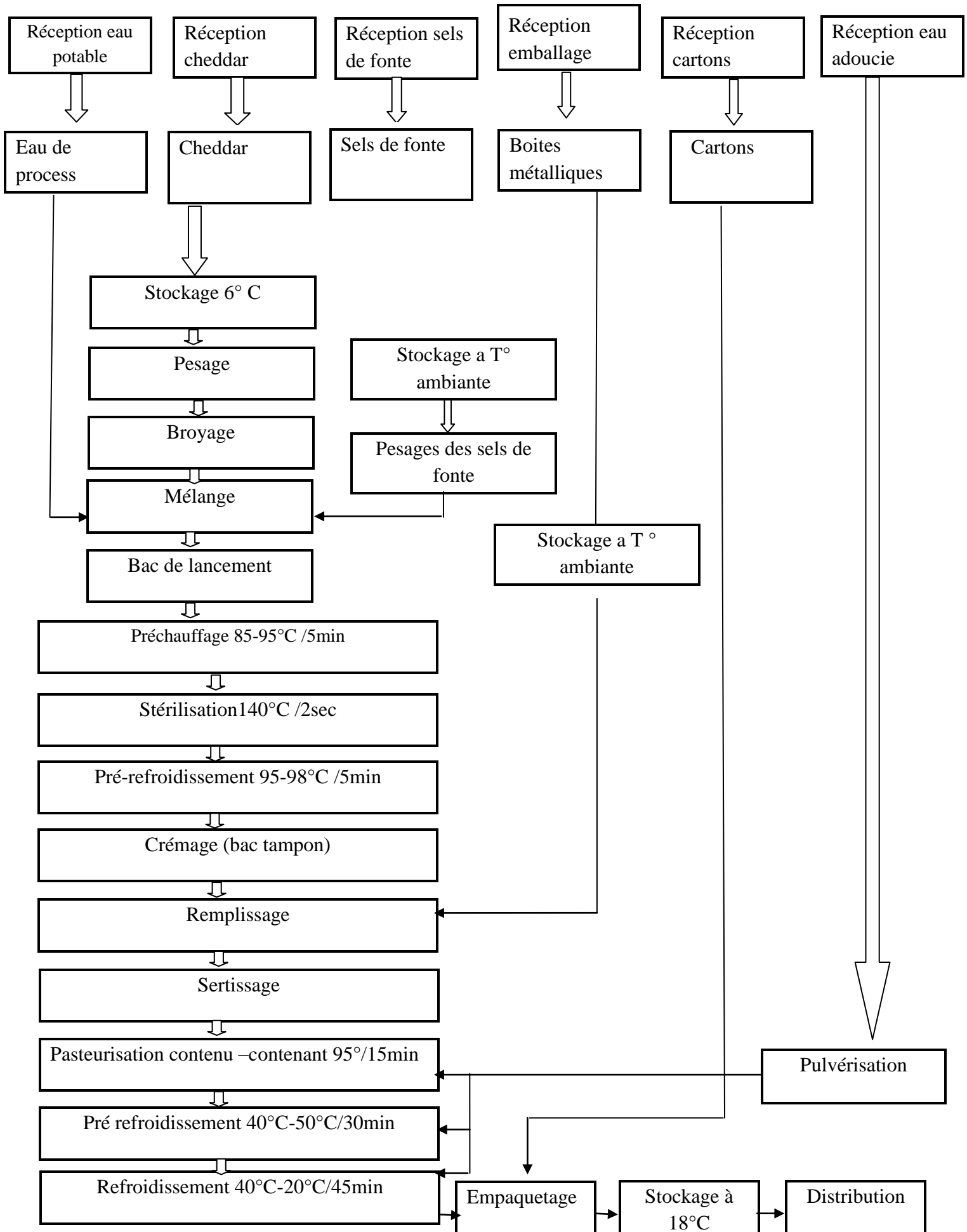
	d'éthanol.		
Fromages fondus	<p>Constitues d'un mélange de fromage(s), de beurre, de crème et de lait, pasteurise (95 °C) soit stérilise (125° C). Appelés <i>aussi fromages remaniés</i>, ils sont de nombreux types dont certains sont obtenus après récupération des fragments de fromages a pate ferme tel que le Gruyère et qui présentent certains défauts.</p> <p>En réalité, il s'agit plus d'une dissolution suivie d'une dispersion de protéines dans l'eau que d'une fonte qui correspond au sens physico-chimique du terme, a la désintégration d'une structure solide cristalline par l'apport d'énergie thermique ou l'exercice d'une pression.</p>	Pas d'ajout de ferments lactiques	Boutounier, <b>2012</b>

## Annexe n° 2

Composition moyenne du fromage fondu pour 100 g de produit frais (**FREDOT, 2006**)

<b>Eau %</b>	50
<b>Energie (Kcal)</b>	330
<b>Glucides (g)</b>	2,5
<b>Lipides (g)</b>	30
<b>Protéines (g)</b>	17
<b>Calcium (mg)</b>	150
<b>Phosphore (mg)</b>	645
<b>Magnésium (mg)</b>	18
<b>Potassium (mg)</b>	100
<b>Sodium (mg)</b>	1100
<b>Zinc (mg)</b>	7

### Annexe 03



## Annexe n° 4

Les indices de Kovats des étalons des H.E analysés sur colonne DB5 Au laboratoire de Technologie Alimentaire de L'ENSA- EX INA

Constituants	Formule	Tr Mn	Indice de Kovats	Alcanes	Tr Des Alcanes
Alpha.Thujène		13.05	929		
A.Pinene	C10H16	13.90	937	C9	11.94 mn
Camphène	C10 H16	14.74	941	C10	18.05 mn
Sabinene		16.82	970		
B.Pinène	C10H16	16.57	971	C11	25.04mn
Myrcene		17.85	986		
Carène	C10H16	18.74	1007	C12	32.24 mn
a.terpinene					
P.Cymene		20.60	1027		
Limonène	C10H16	20.24	1027	C13	39.30mn
Eucalyptol (Cineol)	-----	20.67	1028	C14	46.04 mn
y.Terpinene		22.80	1057		
Linalool	-----	25.20	1099	C15	52.510
Camphre		28.26			
Bornèol	C10H18O1	30.01	1164	C16	5863 mn
Menthol	-----	30.55	1171	C17	64.45 mn
A.Tèrpéneol	C10H18O1	31.83	1189	C18	69.98 mn
Anis-Aldèhyde	-----	34.40	1207	C19	75.25 mn
Citonnellol	-----	34.40	1201	C20	79.27 mn
Nèrol	-----	34.76	1229	C21	84.04 mn
Acétate de Linalyl	-----	34.79	1244	C22	88.68 mn
Citral	-----	37.36	1246	C23	93.00 mn
Thymol	-----	39.07	1287	C24	97.21 mn
Carvacrol		41.01	1334		

Eugenol	-----	43.43	1353	C25	101.27 mn
Acétate de Gèranyl		45.08	1377		
Nerolidol		54.85	1519		

### Méthode de calcul des indices de Kovats : IK

$$IK = 100n + 100 \times \left[ \frac{Tr(A) - Tr(Cn)}{Tr[C(n+1)] - Tr(Cn)} \right]$$

Ou : **IK** est l'indice de Kovats.

**n** est le nombre de carbone de l'alcane précédant immédiatement le composé étudié.

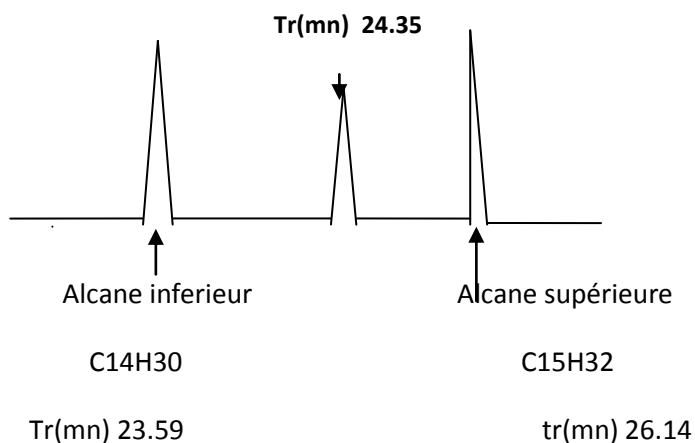
**Tr (A)** est le temps de rétention du composé étudié.

**Tr (Cn)** est le temps de rétention de l'alcane précédent immédiatement le composé étudié.

**Tr C(n+1)** est le temps de rétention de l'alcane à n+1 atomes de carbone suivant immédiatement le composé.

### Exemple de calcul d'un indice

#### Produit inconnu



$$IK = (100 \times 14) + \left[ 100 \times \frac{24.35 - 23.59}{26.14 - 23.59} \right] = 1430$$



## Annexe 05

### La préparation de la courbe d'étalonnage des poly phénols :

#### Mode opératoire :

- 1- On pèse 0,0214g d'acide gallique
- 2- On va dissoudre dans 20ml de méthanol, soit une solution S1
- 3- Diluer la solution mère comme suit :
  - Prélever 5 ml de la solution mère puis ajouter 5 ml de méthanol et l'on obtient la dilution S/2.
  - Prélever 5 ml de la solution S/2 puis rajouter 5 ml de méthanol et l'on obtient la dilution S/4.

#### Traçage de la courbe d'étalonnage d'acide gallique :

- 1- Prélever 1 ml de chaque dilution d'échantillon dans des tubes à essais :
  - 2- Ajouter 1 ml de réactif de Folin – ciocalteu.
  - 3- Après 5 minutes, ajouter 10ml de carbonate de sodium
  - 4- Ajouter 250 ml d'eau distillée
  - 5- Laisser et incuber pendant une heure à température ambiante et à l'abri de la lumière
- La lecture des absorbances se fait à 750 nm.  
Les résultats sont exprimés en mg d'EAG/100g.

## Annexe n ° 6

### Présentation de la Laitière Fromagerie de Boudouaou

La Laitière Fromagerie de Boudouaou est une entreprise créée en 1975 et commencée sa production en 1978. Elle est située à CITE BENAJEL Boudouaou ( W. Boumerdes ) et s'étale sur une surface totale de 7,4 HA dont 1,8 HA construites. Équipements industriels et utilitaires moyens de distribution et de stockage sous froid. L'entreprise dispose aussi d'un laboratoire d'analyse pour réaliser les contrôles physico-chimique et microbiologique des différents produits fabriqués.

LFB est un groupe industriel qui assure la production et la commercialisation du lait et des produits laitiers (poudre de lait, des fromages dont le fromage fondu pasteurisé, fromage fondu stérilisé, le fromage à pâte pressée non cuite de type EDAM, crème fraîche et leben).



## Annexe 07

Annexe n07 : Bulletin du test de  
comparaison par paire

Date :		N° Dégustateur :	
Nom :			
But de l'essai :			
Critère en essai			
Paires en essai	Y a-t-il une différence ?	Quel est l'échantillon le plus aromatisé ?	Quel est l'échantillon préféré ?
<b>Code n° /code n°</b>			
....      ....	Oui    Non	.....	.....
....      ....	Oui    Non	.....	.....
....      ....	Oui    Non	.....	.....
....      ....	Oui    Non	.....	.....
....      ....	Oui    Non	.....	.....
....      ....	Oui    Non	.....	.....
Observation : .....			

## Annexe 08

**Annexe 08:** Table de Roessler, Baker et Amerine pour les tests de comparaison par paire

DEGUSTATEUR	DIFFERENCE			PREFERENCE		
	5%	1%	0,1%	5%	1%	0,1%
7	7	7	-	7	-	-
8	7	8	-	8	8	-
9	8	9	-	8	9	-
10	9	10	10	9	10	-
11	9	10	11	10	11	11
12	10	11	2	10	11	12
13	10	12	13	11	12	13
14	11	12	13	12	13	14
15	12	13	14	12	13	14
16	12	14	15	13	14	15
17	13	14	16	13	15	16
18	13	15	16	14	15	17
19	14	15	17	15	16	17
20	15	16	18	15	17	18
21	15	17	18	16	17	19
22	16	17	19	17	18	19
23	16	18	20	17	19	20
24	17	19	20	18	19	21
25	18	19	21	18	20	21
30	20	22	24	21	23	25
35	23	25	27	24	26	28
40	26	28	31	27	29	31
45	29	31	34	30	32	34
50	32	34	37	33	35	37
60	37	40	43	39	41	44
70	43	46	49	44	47	50
80	80	51	55	50	52	56
90	54	57	61	55	58	61
100	59	63	66	61	64	67

## Annexe n° 9

### Bulletin du test de classement par rang

#### FICHE DE TEST DE CLASSEMENT

N° Dégustateur :

NOM : .....

PRENOM : .....

-Veuillez classer les quatre échantillons par ordre de préférence

DATE : .....

Code

Classement

## Annexe10

**Annexe n° 10:** Différences des sommes de classement par rang absolu critiques pour les comparaisons de «tous les traitements» à un seuil de signification de 1 %

Dégustateurs	nombre d'échantillon									
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3	6	8	11	13	15	18	20	23	25	28
4	7	10	13	15	18	21	24	27	30	33
5	8	11	14	17	21	24	27	30	34	37
6	9	12	15	19	22	26	30	34	37	42
7	10	13	17	20	24	28	32	36	40	44
8	10	14	18	22	26	30	34	39	43	47
9	10	15	19	23	27	32	36	41	46	50
10	11	15	20	24	29	34	38	43	48	53
11	11	16	21	26	30	35	40	45	51	56
12	12	17	22	27	32	37	42	48	53	58
13	12	18	23	28	33	39	44	50	55	61
14	13	18	24	29	34	40	46	52	57	63
15	13	19	24	30	36	42	47	53	59	65
16	14	19	25	31	37	42	49	55	61	67
17	14	20	26	32	38	44	50	56	63	69
18	15	20	26	32	39	45	51	58	65	71
19	15	21	27	33	40	46	53	60	66	73
20	15	21	28	34	41	47	54	61	68	75
21	16	22	28	35	42	49	56	63	70	77
22	16	22	29	36	43	50	57	64	71	79
23	16	23	30	37	44	51	58	65	73	80
24	17	23	30	37	45	52	59	67	74	82
25	17	24	31	38	46	53	61	68	76	84
26	17	24	32	39	46	54	62	70	77	85
27	18	25	32	40	47	55	63	71	79	87
28	18	25	33	40	48	56	64	72	80	89
29	18	26	33	41	49	57	65	73	82	90
30	19	26	34	42	50	58	66	75	83	92
31	19	27	34	42	51	59	67	76	85	93
32	19	27	35	43	51	60	68	77	86	95
33	20	27	36	44	52	61	70	78	87	96
34	20	28	36	44	53	62	71	79	89	98
35	20	28	37	45	54	63	72	81	90	99
36	20	29	37	46	55	63	73	82	91	100
37	21	29	38	46	55	64	74	83	92	102
38	21	29	38	47	56	65	75	84	94	103
39	21	30	39	48	57	66	76	85	95	105
40	21	30	39	48	57	67	76	86	96	106
41	22	31	40	49	58	68	77	87	97	107
42	22	31	40	49	59	69	78	88	98	109
43	22	31	41	50	60	69	79	89	99	110
44	22	32	41	51	60	70	80	90	101	111
45	23	32	41	51	61	71	81	91	102	112
46	23	32	42	52	62	72	82	92	103	114
47	23	33	42	52	62	72	83	93	104	115
48	23	33	43	53	63	73	84	94	105	116
49	24	33	43	53	64	74	85	95	106	117
50	24	34	44	54	64	75	85	96	107	118
55	25	35	46	56	67	78	90	101	112	124
60	26	37	48	59	70	82	94	105	117	130
65	27	38	50	61	73	85	97	110	122	135
70	28	40	52	64	76	88	101	114	127	140
75	29	41	53	66	79	91	105	118	131	145
80	30	42	55	68	81	94	108	122	136	150
85	31	44	57	70	84	97	111	125	140	154
90	32	45	58	72	86	100	114	129	144	159
95	33	46	60	74	88	103	118	133	148	163
100	34	47	61	76	91	105	121	136	151	167

## Annexe 11

**Annexe n° 11:** bulletin pour le test hédonique avec un barème de notation allant de 1 à 9

### FICHE DE TEST HEDONIQUE

N° Dégustateur :
------------------

NOM : .....

PRENOM : .....

DATE : .....

Veillez examiner et goûter chaque échantillon de fromage, et donnez une note de 1 à 9 selon l'intensité du caractère.

Echantillon			
A	B	C	D

<b>Texture</b>	Liquide				
	Grasse				
	Crémeux				
	Onctueuse				
	Fluide				
	Fine				
	Souple				
	Nappent				
<b>Couleur</b>	Jaune				
<b>Odeur</b>	Levuré				
	Fromage				
	Herbe vert				
	Fruit sec				
	Orange				
	De rance				
<b>Goût</b>	Acide				
	Salé				
	Sucré				
	Amère				
<b>Arôme</b>	Fromage				
	Orange				
	Noisette				
	Lait cru				
	Fruit sec				

Annexe 12



les fruits d'orange extraite.



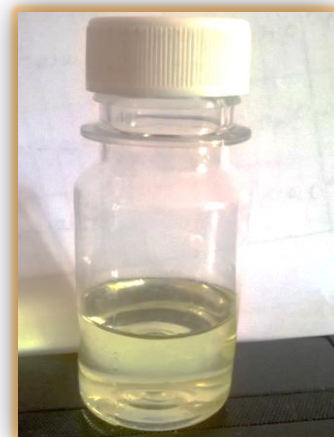
Découpage de l'écorce d'orange en petit fragment pour broyage



Matériel végétal (zeste d'orange récupéré après broyage).



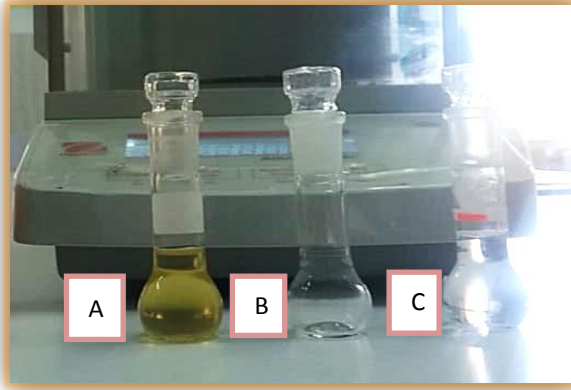
Extraction d'huile essentielle à partir du zeste d'orange par hydrodistillation



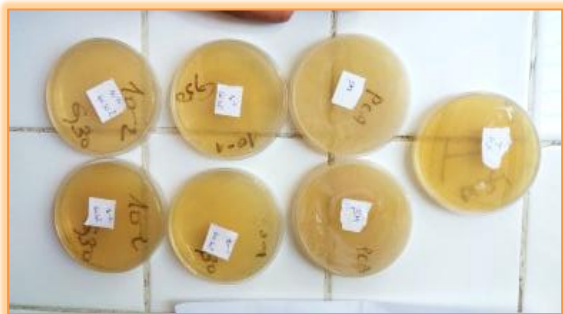
Huile essentielle d'orange extraite



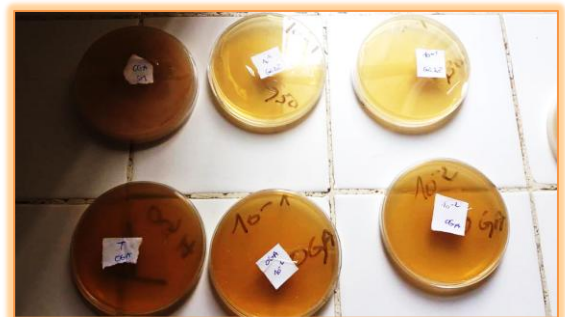
### Annexe 13



Pycnomètres remplis avec : (A) H.E d'orange / (B) vide / (C) eau distillée, pour la détermination des paramètres de densité relative



Résultats de la lecture des levures et moisissures après 5 jrs



Résultats de la lecture de la recherche des FTAM après 72h

## Annexe 14



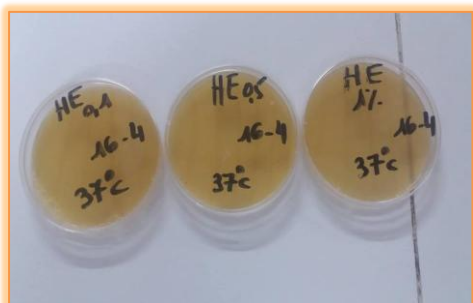
Les échantillons de fromage élaborés à différentes concentrations



Résultat de la lecture de taux de matière grasse de fromage élaborés par un butyromètre



Résultat de la détermination de l'extrait sec total des fromages élaborés



Résultat de recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus*

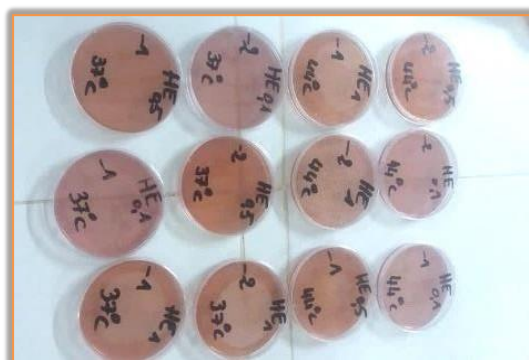
## Annexe 15



Résultats de la recherche de *Salmonella* (1. Etape de pré. Enrichissement / 2 Etape d'enrichissement / 3. Etape d'isolement)



Résultats de *Clostridium sulfito réducteur*.



Résultats de La lecture des boites de coliformes totaux (à 37°C après 48h) et les coliformes fécaux (à 44°C après 48h)

## Résumé :

L'objectif de notre étude est de mettre en évidence le rôle conservateur et aromatisant de l'huile essentielle d'orange sur le fromage fondu afin de diversifier les différents types de fromages déjà existants. L'huile essentielle a été extraite par hydrodistillation, le rendement obtenu est équivalent à 1,4%. Cette huile à montrer une activité antioxydant très important (inhibition de presque 90% de radical libre) et une teneur en polyphénols, flavonoïdes et limonène de l'ordre de  $0.27 \pm 0.106$  mg eq.ac.gallique/g,  $1.17 \pm 0.78$  mg eq.de .gallique/g d'échantillon et 95.21% respectivement. L'huile essentielle d'orange à été incorporé aux concentrations de 0.1% ,0.5 % et 1% au fromage fondu.

Les résultats de la qualité hygiéniques des fromages élaborés ont montré que l'ajout des huiles essentielles de l'orange au fromage fondu peut jouer un rôle d'un conservateur dans le fromage à des concentrations de 0.1 ,0.5 et 1 ml/100g et il peut prolonger la durée de consommation de fromage fondu à sept et dix jours respectivement. La date limite de fromage fondu non incorporé étant de Cinq jours seulement.

Sur le plan sensoriel, l'incorporation de l'huile essentielle dans le fromage fondu à des concentrations de 0,1% et 0,5% n'entraîne aucune différence significative du point de vue aromatisation, et donnent des produits classés indifféremment avec le témoin. Le taux d'incorporation de l'huile essentielle de 1% a déclassé significativement le produit par rapport au témoin en troisième rang, en donnant l'odeur et l'arôme d'orange.

**Mots clés :** huile essentielle, fromage fondu, antioxydant, plan sensoriel.

## Abstract :

The objective of our study is to highlighting the conservative and flavoring role of the essential oil of orange on the processed cheese. In order to diversify the different types of cheese already existing.

This essential oil was extracted by hydrodistillation, the yield obtained is equivalent to 1,4%. This oil has a very important antioxidant activity (inhibition of almost 90% of free radical) and a content of polyphenols, flavonoides and limonene of the order of  $0.27 \pm 0.106$  mg eq.ac.gallique/g,  $1.17 \pm 0.78$  mg eq.de .gallique/g of échantillon and 95.21% respectively.

The essential oil of orange has been incorporated at concentrations of 0.1% ,0.5% and 1% of the processed cheese. The hygienic quality results of elaborate cheeses have shown that the addition of essential oils from orange ti cheese can play a role of a preservative in cheese at concentrations of 0.1 , 0.5 and 1 ml/100g and it can extend the duration of consumption of processed cheese to seven and ten days respectively.

The deadline for uncorporated processed cheese being only five days.

At the sensory analysys, the incorporation of the essential oil into the melted cheese at concentrations of 0, 1% and 0, 5%, causes no significant difference from the point of view of aromatization ,and gives products classified indifferently with the witness. The rate of incorporation of the 1% essential oil significantly downgraded the product compared to the third rank control , giving the smell and aroma of orange.

**Keywords:** essential oil, melted cheese, antioxydant, sensory analysis

## ملخص

الهدف من دراستنا هو ابراز دور الحافظ و المنكه لزيت البرتقال العطري في الجبن المطبوخ من أجل تنوع أنواع الجبن المختلفة. تم استخراج الزيت العطري بواسطة hydrodistillation

الناتج الذي تم الحصول عليه يعادل 1.4%

هذا الزيت له نشاط مضاد للأكسدة مهم جدا (تثبيط ما يقرب من 90% من الجذور الحرة) و محتوى البوليفينول و الفلافونويد و الليمونين من ترتيب 0.27 , 1.17 , و 95.21% على التوالي

تم دمج زيت البرتقال الأساسي بتركيز 0.1% و 0.5% و 1% مع الجبن الذائب.

أظهرت نتائج الجودة الصحية للأجبان ان اضافة الزيوت العطرية من البرتقال الى الجبن يمكن ان تلعب دورا حافظ في الجبن بتركيزات 0.1 و 0.5 و 1 مل / 100 غرام و يمكنها تمديد مدة استهلاك الجبن الذائب الى سبعة و عشرة أيام على التوالي بينما تكون مدة نهاية صلاحية الجبن الذائب خمسة أيام فقط .

على المستوى الحسي ، فان دمج الزيت العطري في الجبن الذائب بتركيزات 0.1% و 0.5% لا يسبب اختلافا كبيرا من وجهة نظر الروائح ، و يمنح المنتجات تصنيفات مختلفة عن الشاهد .

معدل دمج 1% من الزيت العطري خفضت بشكل كبير المنتج مقارنة بالشاهد في الصف الثالث ، مما يعطي نكهة و رائحة للبرتقال بمعدل كبير .

الكلمات المفتاحية : الزيت العطري ، الجبن الذائب ، مضادات الأكسدة ، التحاليل الحسية.