

République Algérienne démocratique et populaire
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la recherche Scientifique

Université A .Mira –Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Science alimentaire

Spécialité des Sciences des Corps Gras



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

*Formulation d'une margarine enrichie avec le miel comme
Alternative aux conservateurs chimiques*

Présenté par :

Ghilas Ouassila & Benremila Thinhinane

Soutenu le : **30 /06 /2019**

Devant le jury composé de :

Mr. TAMENDJARI A.	PR	Président
Mme OUCHEMOUKH N.	MCB	Promotrice
Mme. HASSISSENE N.	MCB	Examinatrice

Année universitaire : 2018/2019

Remerciement

*On remercie d'abord **DIEU** de nous avoir donné assez de force et de courage pour finir ce travail*

*Nous tenons à remercier notre promotrice Mme **OUCHEMOUKH Nadia** pour avoir accepté de nous encadrer, leurs précieux conseils avisés, leur soutien, et leur gentillesse en nous a énormément servi.*

*Nous remercions l'ensemble du personnel du laboratoire de l'entreprise **COGB** la belle qui a contribué au bon déroulement du stage.*

*Nous remercions également les membres du jury Mr **TAMENDJARI Abderezak** et Mme **HASSISSENE Nadia** pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre étude, en acceptant d'examiner et d'évaluer notre travail.*

Nous remercions tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicace



Je dédie ce Travail

A Mes très chers parents à qui je ne trouve pas de mots pour les remercier,

Je n'oublierais jamais ce que vous faites pour moi,

Merci d'être là pour moi,

A Mes très chers frères Hakim et Dalil.

A Mes sœurs Khoukha. Leila. Nassima. Souad. Lynda et Lydia.

A Ma belle sœur Naima.

A Mes beaux frères Zahir. Ali. Azdine et Djebbar.

A Mes neveux Chrif. Habib. Kaci. Zakaria. Djalal. Anir et Ayoub.

A Mes nièces Mélissa. Sophia. Yasmine. Rihame et Sydra.

A Toute ma famille sans exception, Oncle, Tantes, Cousins et Cousines.

A Mes chères amies ainsi que la promotion SCG 2019.

BENREMILA THINHINANE.

Dédicace



Je Dédie ce travail à :

Mes chers parents que le dieu les protège pour leur soutien et leur encouragements durant toute ma vie.

Mon mari Amirouche qui ma aidé et ma encouragé pour finir ce travail

Mes sœurs :

Nassima et Cessilia

Mes frères :

Karim, sa femme et ses enfants Farah, Fouad et Férial.

Idir, sa femme et sa fille Amina

Faham, Mourad et Salim

Ma belle mère, mon beau père, mes belles sœurs et mes beaux frères

A tous ce qui m'ont aidé de près ou de loin dans la réalisation de ce travail

Ghilas.W

Liste des abréviations

AGE : Acides gras essentiels

A: Acidité

Aw: Water activity

BHA: L'hydroxyanisole butyle

BHT: L'hydroxytoluène butyle

COGB: Corps gras de Bejaia

DPPH : 1-1 Diphényle-2-Picrylhydrazyl

H: Humidité

IP: Indice de peroxyde

% IP : Pourcentage d'inhibition

ISO: Organisation Internationale de Standardisation.

KI : Iodure de potassium

M0, M1, M2, M3, M4, M5 : échantillons de margarine

NaCl : Chlorure de sodium

PI : pourcentage d'inhibition

PH: Potentiel hydrique

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire

SFC: Solide Fat Content

Ts: Taux de sel

UV : Ultra Violet

Liste des figures

Figure 1 : Photographie de la margarine.....	4
Figure 2 : Photographie du miel	12
Figure 3 : Indice de peroxyde pour les six échantillons de margarine	25
Figure 4 : point de fusion pour les échantillons M4 et M5.....	26
Figure 5 : Taux d'acidité pour les six échantillons de margarine.....	27
Figure 6 : T aux de sel pour six échantillons de margarine.....	29
Figure 7 : Taux de solide (SFC) des deux échantillons de margarine M0 et M2.....	30

Liste des tableaux

Tableau I : Composition globale de la margarine.....	5
Tableau II : Mécanisme d'oxydation des lipides.....	9
Tableau III : Les principaux facteurs qui provoquent l'oxydation.....	10
Tableau IV : Les échantillons de margarine élaborés en fonction des différentes quantités du miel ajoutées.....	18
Tableau V : Taux d'humidité pour les 6 échantillons de margarine.....	28

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction 1

I- Les corps gras 3

1- Généralités 3

2-Définition des corps gras 3

3- Classification des corps gras 3

3-1 Corps gras naturels 3

3-2 Corps gras élaborés 3

4- La margarine 4

4-1 Définition de la margarine 4

4-2 Valeur nutritionnelle de la margarine 4

4-3 Composition de la margarine 4

4-3-1 Phase grasse 5

4-3-2 Ingrédients liposolubles 5

4-3-3 Phase aqueuse 6

4-4 Technologie de fabrication de la margarine 6

4-5 Types de margarine 7

4-7 Conservation de la margarine 7

5- Oxydation de la margarine 8

5-1 Mécanisme de l'oxydation des lipides 8

5-2 Types d'oxydation 9

5-2-1 Auto-oxydation 9

5-2-2 Oxydation enzymatique 9

5-2-3 Photo- oxydation 9

5-3 Facteurs les plus importants promouvant l'oxydation 10

6- Antioxydants 10

II-Généralités sur le miel 12

1- Définition du miel 12

2- Composition du miel.....	12
3 - Propriétés physicochimiques et biologiques du miel.....	14
3-1 Propriétés physicochimiques	14
3-2 Propriétés biologiques.....	15
4- Composés responsables de l'activité antioxydante du miel.....	16
5- Critères de la qualité du miel	16
I-Matériel et méthodes	18
1- Formulation de la margarine	18
2- Analyses physico- chimiques effectuées sur la margarine	18
2-2 Détermination du point de fusion (ISO 63 21, 2002).....	19
2-3 Détermination du l'acidité « ISO.1.2.97-1998 ».....	20
3- Antioxydant et activité antioxydante du miel	23
3-2 Composé phénoliques	23
II-Résultats et discussion	25
1-Résultats des analyses physico-chimiques effectuées sur la margarine.....	25
1-1 Indice de peroxyde	25
1-2 Point de fusion	26
1-3 Acidité(%).....	27
1-4 Humidité(%)	28
1-5 Taux de sel	28
1-6 Taux de solide	29
1-7 pH de la phase aqueuse	30
2-Antioxydants et activité antioxydante du miel.....	30
2-1 Teneurs en composés phynoliques et flavonoïdes	30
2-2 Pouvoir antiradicalaire de DPPH	31
Conclusion	32

Introduction

Introduction

Les corps gras sont des aliments dont le pourcentage en lipides (esters d'acides gras et alcools) est très élevé. Certains contiennent près de 100% de lipides. D'autres, émulsion d'eau ou de lait écrémé fermenté dans des lipides, ont une teneur lipidique comprise entre 80 et 90 % : tels que le beurre, la margarine et les matières grasses composées (Elisabeth, 2008). La margarine est un corps gras alimentaire sous forme d'émulsion eau /huile, elle est constituée de deux phases : la phase continue (la phase grasse) et la phase dispersée (la phase aqueuse) plus d'additifs technologiques et nutritionnels répartis dans les deux phases (François, 1974). La margarine est l'une des sources énergétiques principales en alimentation humaine. Elle est aussi vecteur de vitamines, d'acides gras essentiels et d'autres constituants mineurs bénéfiques pour la santé (Poisson et Narce, 2003).

L'altération des corps gras ou rancissement (changement de leur qualité organoleptique : goût ou odeur) est d'origine oxydative ou enzymatique. Les huiles végétales sont plus stables à l'oxydation que les graisses animales ; ce résultat est dû à la présence de substances de nature phénolique dites anti-oxygène ou inhibiteurs qui stoppent momentanément la fixation d'oxygène sur les chaînes insaturées comme le tocophérol ou la vitamine E (Acem, 2016). Le développement du rancissement et d'autres mauvais goûts est la manifestation la plus connue de l'oxydation lipidique. Cette dernière diminue la valeur nutritionnelle des aliments, telles que les acides gras essentiels (AGE) et certaines vitamines (Gaille, 2003)

Les antioxydants synthétiques sont pratiquement tous les composés phénoliques para-substitués avec des groupes actifs. Les plus connus sont L'hydroxytoluène butyle (BHT) et L'hydroxyanisole butyle (BHA). Ils peuvent être utilisés en générale à des concentrations de l'ordre de 0,02 % par rapport à la matière grasse. Néanmoins, les composés synthétiques sont suspectés de toxicité par les consommateurs. Par conséquent, les antioxydants naturels ont une meilleure image, d'où la plupart des recherches actuelles convergent vers la recherche d'antioxydants naturels pour substituer les antioxydants synthétiques (Shahidi, 1997).

Le miel est une source importante d'antioxydants naturels. Plusieurs travaux scientifiques ont déterminé le pouvoir antioxydant du miel et sa richesse en polyphénols. Les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes, etc.) sont des antioxydants

primaires ou antiradicalaires qui inhibent la propagation des réactions radicalaires en fournissant des hydrogènes aux radicaux (Lachman *et al.*, 2010).

Dans le présent travail, nous nous intéressons à la formulation d'une margarine enrichie avec le miel et à l'étude de sa stabilité au cours de sa conservation au niveau de l'entreprise COGB labelle. La margarine élaborée est dépourvue de la vitamine E qu'on a remplacée par le miel qui est un extrait naturel et une source importante d'antioxydants naturels tels que les flavonoïdes et polyphénols.

Ce manuscrit est divisé en deux parties : la première concerne une synthèse bibliographique portant sur les corps gras et sur les généralités sur le miel. La deuxième partie dite : pratique ou expérimentale, portera sur le travail pratique, qui est consacrée à une présentation du matériel et les méthodes d'analyses puis une discussion des résultats obtenus.

Synthèse bibliographique

I- Les corps gras

1- Généralités

Les corps gras, qui correspondent à la partie « graisses neutres » de la fraction lipidique totale dans certains tissus animaux et végétaux, ont surtout un rôle nutritionnel sur les plans énergétiques et métaboliques. Les corps gras alimentaires comprennent les huiles et les graisses d'origine végétale ou animale qui ont l'impact nutritionnel qui a toujours fait l'objet de beaucoup d'attention. Les matières grasses constituent, en effet, l'une des ressources énergétiques principales en alimentation humaine et à côté de l'aspect énergétique, les graisses sont aussi vecteurs de vitamines liposolubles, d'acide gras essentiel et autres constituants mineurs, tous bénéfiques pour notre santé (Chaftel et Chaftel, 1977).

2-Définition des corps gras

Sont les graisses et les huiles d'origine animale ou végétales qui constituent de triglycérides résultants de la combinaison d'un glycérol et de trois unités d'acides gras. Elles sont insolubles dans l'eau mais solubles dans la plupart des solvants organiques et leur densité est plus faible que celle de l'eau (Denise ,1992).

3- Classification des corps gras

3-1 Corps gras naturels

Les corps gras naturels sont essentiellement constitués par des triglycérides qui sont des triesters, des acides gras et de glycérol. Ils renferment en outre en faibles quantités des phospholipides, des stérols, des alcools, des vitamines, des pigments, des hydrocarbures...désignés dans leur ensemble sous le nom « constituants non glycéridique » ou « constituants mineurs. Ces corps gras sont réparti en deux groupes : Les corps gras d'origine végétale (arachides, colza, maïs, coton, palm, olive, etc...), et les corps gras d'origine animale (les suifs, les saindoux, les huiles et les graisses marines...) (Cross, 1968 ; François, 1974).

3-2 Corps gras élaborés

Les industries agroalimentaires modifient les corps gras en vue de leur donner des propriétés nouvelles, telle une plasticité adaptée à chaque utilisation (Elisabeth, 2008).

Il existe deux types de corps gras élaborés qui sont le beurre et la margarine (François, 1974).

4- La margarine

4-1 Définition de la margarine

La margarine est une émulsion du type eau dans huile (W/O) et comprend deux phases : la phase continue qui est la phase grasse et la phase dispersée qui est la phase aqueuse. Elle contient aussi des additifs et auxiliaires de fabrication répartis dans les deux phases (Karleskind, 1992). La margarine était préparée au début en émulsionnant des graisses animales avec l'eau et du lait ou de la crème. Aujourd'hui On emploie une grande variété d'huiles végétales plus au moins hydrogénées (Cheftel et Cheftel, 1977).



Figure 1 : Photographie de la margarine (Anonyme, 2018) .

4-2 Valeur nutritionnelle de la margarine

La margarine est une excellente source des vitamines liposolubles (ADE) qui sont douées d'une bonne digestibilité, qui est expliquée par l'état d'émulsion dans laquelle se trouve le produit qui favorise notablement leur absorption et utilisation (Champtier, 1956). En plus, la margarine apporte de l'énergie métabolique (7500 Cal/kg), et des acides gras essentiels (surtout linoléique) (François, 1974).

4-3 Composition de la margarine

En général, toutes les margarines ont une composition globale identique (Tableau I).

Tableau I : Composition globale de la margarine (Karleskind and Wolff, 1992; Karleskind, 1996).

Composé	Pourcentage (%)
Phase grasse	80 à 82 % de lipides
Phase aqueuse	16 à 18 % d'eau et/ou lait
additifs	2 %

4-3-1 Phase grasse

La phase grasse représente la partie la plus importante de l'émulsion qui peut être d'origine végétale, animale ou marine selon les performances souhaitées par la production (Mori, 2005). Elle est constituée essentiellement de blend(mélange d'huiles) qui peuvent être variés comme suit :

- ❖ **Corps gras non modifiés** : sont utilisés tels quels comme les graisses végétales concrètes (coco, palme, palmiste) et graisses animales(les suifs, saindoux) (Acem, 2016).
- ❖ **Corps gras hydrogénés**: l'hydrogénation à pour but de réduire l'insaturation des corps gras et d'améliorer corrélativement leur stabilité en vers l'oxydation (Faur, 1992).
- ❖ **Corps gras interestérifiés** : l'interestérisation est une opération de modifier certaines propriétés physiques par une nouvelle distribution des acides gras constitutifs sur les fonctions hydroxylées de glycérol (Faur, 1992).
- ❖ **Corps gras fractionnés** : la cristallisation des graisses(en présence, ou pas, d'un solvant) suivie d'une décantation ou d'une pression, permet de séparer ces derniers en deux fractions liquide et solide, aux propriétés physiques et chimiques différentes ; comme l'huile de palme ou graisse de suif (François, 1974).

4-3-2 Ingrédients liposolubles

- ❖ **Emulsifiants** : ils ont pour rôle d'assurer une bonne dispersion de la phase aqueuse dans la phase grasse et de stabiliser l'émulsion par réduction de la tension interfaciale entre les deux milieux (Dickinson, 1996).
- ❖ **Colorants** : la couleur des margarines est apportée par l'usage d'huiles fortement pigmentées et riches en β -carotène pur, de synthèse ou d'extraction (Acem, 2016).
- ❖ **Vitamines** : il s'agit des vitamines ADE qui sont naturelles ou synthétiques. Elles sont employées comme anti -oxygènes, additionnées de substances dites synergiques, comme

l'acide citrique ou phosphorique qui complètes leur action stabilisatrice (François, 1974 ; Faur, 1992).

- ❖ **Arômes** : la margarine est aromatisée par des arômes de synthèse (par exemple, le diacétyle ou 2,3 butanedione, l'un des nombreux composants de l'arôme de beurre), ou par des préparations aromatisants plus complexe (cocktail d'arômes) conformes aux dispositions réglementaires relatives à ces substances (Faur et Madsen, 2002)

4-3-3 Phase aqueuse

La phase aqueuse est composée des éléments suivants :

- ❖ **L'eau** : c'est le constituant le plus important dans la phase aqueuse de la margarine sans lait, cette eau doit être hygiéniquement propre, neutre de goût et d'odeur (O' Brien, 2009).
- ❖ **Lait** : doit être pasteurisé, écrémé, et généralement additionné de ferments lactiques qui développent un arôme agréable proche de celui du beurre (Faur, 1992).
- ❖ **Les conservateurs** : ils constituent une classe d'additifs indispensables, prolongent la durée de conservation des denrées alimentaires (Becker *et al*, 2009).
- ❖ **Le sel** : son rôle est d'améliorer la sapidité et il peut jouer un rôle de protecteur « Bactériostatique ». Les teneurs peuvent varier de 0,1 à 1% et même 2 % (Faure, 1996).
- ❖ **Correcteur de pH** : l'acide citrique est un antioxydant synergique (avec l'acide sorbique) puissant qui permet le contrôle de pH de la phase aqueuse, son utilisation est autorisée à des doses maximales de 0,1% (Alaise et Linden, 1997).

4-4 Technologie de fabrication de la margarine

La fabrication de la margarine comprend les étapes suivantes :

- ❖ **Préparation de la phase grasse** : les huiles et les graisses raffinées et/ou modifiées par hydrogénation, interestérisation ou fractionnement de différents points de fusion et des ingrédients liposolubles, lécithine, monoglycérides, colorants et vitamines (Faur, 1992).
- ❖ **Préparation de la phase aqueuse** : cette phase constitue de l'eau ou/et lait qui doivent subir une pasteurisation préalable, puis ils sont ajoutés de conservateurs, sel, arôme, correcteurs pH (Karleskind, 1992).
- ❖ **Préparation de l'émulsion** : se fait à l'aide d'une pompe d'émulsion proportionnelle et agitation pour disperser finement la phase aqueuse dans la phase grasse avec les émulsifiants (Faur, 1992). Le mélange passe vers le pasteurisateur à une température de 80°C/16 sec. puis il passe vers le combinateur sous une température de 45°C grâce à la pompe de pression (Robert et Whitehurst, 2004)

- ❖ **Cristallisation** : le refroidissement, la cristallisation et le malaxage sont réalisés d'une façon à conférer à la margarine les caractéristiques rhéologiques ainsi que la stabilité (Graille, 2003).
- ❖ **Conditionnement et Stockage** : la margarine est pompée dans une pompe doseuse à haute pression puis conditionnée, le produit fini est mis en carton puis sur des palettes, puis stocké. Selon le produit le temps de stockage est plus ou moins long à une température de 10°C (Cossutet *al.*, 2002).

4-5 Types de margarine

- **Margarine pour usage domestique** : Destinée aux emplois ménagers culinaires.
- **Margarine diététique** : fabriquée spécialement pour certains emplois particuliers (régime diététique, accompagnant des traitements thérapeutiques).
- **Margarine pour industrie alimentaire** : les propriétés fonctionnelles recherchées sont soit l'absence d'acides gras libres et les stabilités à haute température, soit une plasticité convenable dans le cas où elle est destinée à la biscuiterie (François, 1974)

4-6 Facteurs d'altération de la margarine

L'altération de la margarine peut être d'ordre chimique, bactériologique ou physique (Trémolieres *el al.*,1980). La margarine, étant formée d'un taux élevé de matière grasse, est souvent exposé aux risques d'oxydation (Clements et Decker, 2000). Cette dernière est à l'origine de l'odeur de rance, du goût désagréable, du changement de couleur ainsi que des pertes d'activités vitaminiques et de la valeur nutritive. Comme tout produit alimentaire, la margarine à risque d'être contaminée par des microorganismes qui, en se développant, provoquent une altération des qualités organoleptiques (flaveur, texture ...) et/ou des propriétés chimiques (Cossutet *al.* 2002). L'altération physique est due à la modification de la consistance de la margarine. Elle est due à son phénomène de recristallisation. La formation de ses cristaux entraîne la réduction de la phase liquide par apport à la phase solide et conduit en générale à la perte de la texture, la flaveur et l'apparence recherchée (Clementet *al.* 2000 ;Genotet *al.*, 2003) .

4-7 Conservation de la margarine

La margarine a les mêmes pratiques de conservation que le beurre, ses pratiques sont classées comme suite :

- ❖ La pasteurisation de la crème qui détruit les enzymes et la flore microbienne contaminante du lait.
- ❖ Un contrôle microbiologique sévère tout au long de la fabrication.
- ❖ Le respect des températures maximales de la maturation jusqu'au malaxage.
- ❖ La réfrigération pendant le stockage.
- ❖ Un emballage approprié qui évite la lumière (feuilles d'aluminium), le contact avec les métaux catalyseurs d'oxydation (papier sulfurisé), et l'oxygène de l'air.
- ❖ Une température de stockage souhaitée comprise entre 0 et 5°C.

Les qualités organoleptiques de la margarine ne varient pas pendant 3 mois, d'autant que certains additifs (acide sorbique, par exemple), ont pour but de limiter la flore microbiologique (Elisabeth, 2008)

5- Oxydation de la margarine

L'oxydation des lipides est l'une des principales causes de l'altération de la qualité des aliments, cette réaction de détérioration diminue la valeur nutritionnelle de ces dernières (Warner *et al.*, 1989). C'est la cause majeure de dégradation de la margarine lors de sa fabrication et aussi pendant sa conservation, Elle affecte les acides gras insaturés présents (Martin et Andriantsitohaina, 2002). Cette oxydation est généralement influencée par les antioxydants, qui sont à proprement parler des inhibiteurs de l'oxydation (Holasova *et al.*, 1993).

5-1 Mécanisme de l'oxydation des lipides

L'oxydation des lipides est une réaction dont les principaux mécanismes sont globalement connus (Tableau II) (Labuza et Dugan, 1971 ; Frankel, 2005).

Tableau II: Mécanisme d'oxydation des lipides (Graille, 2003).

Type d'oxydation	lipides oxydés	catalyseurs	Agent oxydant	Prévention
Auto-oxydation	Tous les lipides insaturés	Métaux lourds, radicaux libres	Oxygène triplet	antioxydants
Oxydation enzymatique	Lipides polyinsaturés	lipoxygénases	Oxygène triplet	Inactivation des enzymes
Oxydation due à l'oxygène singulet	Tous les lipides insaturés	Molécules photosensibles	Oxygène singulet	Piégeurs d'oxygène singulet

5-2 Types d'oxydation

L'oxydation se subdivise en trois types principaux qui sont les suivants :

5-2-1 Auto-oxydation

L'auto- oxydation est une réaction spontanée ses molécules d'oxygène avec des lipides, conduisant à une détérioration oxydative(Graille, 2003).

5-2-2 Oxydation enzymatique

L'oxydation enzymatique est catalysée le plus souvent par les lipoxygénases (Piazza and Nùoez 1995). La lipoxygénasecatalyse l'insertion d'une molécule d'oxygène sur un acide gras insaturé qui abouti à la formation d'hydroperoxydes. Son activité est toujours couplée avec celles des lipases et des phospholipases (Eymard, 2003).

5-2-3 Photo- oxydation

L'oxydation par l'oxygène singulet est très intense dans les aliments exposés à la lumière visible et ultraviolette .En présence d'un photosensibilisateur, l'énergie irradiante convertit l'oxygène normal à l'état triplet en oxygène à l'état singulet, qui est mille fois plus actif que l'oxygène dans son état triplet.

L'oxygène à l'état singulet s'additionne très rapidement sur les doubles liaisons, formant des intermédiaires instables transformés à leur tour en hydroperoxydes plus stables.

Les photosensibilisateurs les plus connus sont les chlorophylles, phéophytines, les métalloporphyrines et les riboflavines. Ainsi, les huiles alimentaires conservées dans des bouteilles incolores, où elles ne sont pas protégées de la lumière, doivent être exemptes de produits chlorophylliens (Min, 1998).

5-3 Facteurs les plus importants promouvant l'oxydation

L'oxydation est due le plus souvent à plusieurs facteurs qui sont regroupés dans le (tableau III).

Tableau III : Les principaux facteurs qui provoquent l'oxydation (Clementset Decker, 2000).

Facteur	Contrôle
Chaleur	éviter l'exposition aux températures élevées
Lumière	éviter l'exposition à la lumière
Oxygène	Supprimer l'oxygène
Pro-oxydants (traces métalliques)	Supprimer ou utiliser, par exemple, des agents complexants
Enzymes	Supprimer /inactiver des enzymes
Activité de l'eau (aw)	Assurer une (aw) optimale
Photo- sensibilisateur	Supprimer les agents photo-sensibilisateurs et /ou éviter l'exposition à la lumière
Déficit en antioxydant	Addition d'antioxydants

6- Antioxydants

Les antioxydants sont des composés capables de retarder ou d'empêcher des processus oxydatifs ; ils peuvent être définis comme :

- ❖ Des substances capables d'interrompre la chaîne radicalaire, ce sont des antioxydants primaires qui réagissent avec des radicaux lipidiques de haute énergie les convertissant en produits thermodynamiquement plus stables.
- ❖ Des antioxydants préventifs, qui agissent en synergie avec les antioxydants primaires en réduisant des facteurs promouvant l'oxydation, ce sont par exemple des absorbants d'oxygène et des agents complexant les métaux (Prior, 2003).

Les antioxydants peuvent être classés en deux classes :

- **Antioxydants synthétiques**

L'efficacité d'utilisation d'antioxydants synthétiques a été strictement réglementée en raison de leur potentiel effets cancérigènes et toxiques tels indiqués par des études cellulaires ou animales (Branen, 1975 ; Botterwecket *al.*, 2000).

Les antioxydants de synthèse classiques les plus connus sont BHT(E321) et BHA (E320) qui présentent une très bonne liposolubilité et une excellente efficacité dans les huiles végétales (Judde, 2004).

- **Antioxydants naturels**

Les antioxydants naturels présents dans les aliments d'origine végétale protègent contre les dommages causés par les radicaux libres ; Il sont donc des outils importants pour obtenir et préserver une bonne santé (Dell Agliet *al.*, 2004 ; Scoorbrateet *al.*, 2005).

II-Généralités sur le miel

1- Définition du miel

Le miel est la substance naturelle sucrée produite par les abeilles *Apis mellifera* à partir de nectar de plante ou à partir des sécrétions provenant des parties vivantes des plantes. C'est l'un des aliments les plus complexes qui sont produits par la nature. Il a été rapporté que le miel contient jusqu'à 200 substances, il est considéré comme une partie importante de la médecine traditionnelle (Yaiche et Khali, 2014).



Figure 2: Photographie du miel (Anonyme, 2018)

2- Composition du miel

La composition du miel varie en fonction des espèces végétales, du climat, des conditions environnementales et de la contribution de l'apiculture (Yaiche et Khali, 2014)

❖ Glucides

Les deux sucres les plus abondants sont le fructose et le glucose. Tous deux sont des monosaccharides qui répondent à la formule globale $C_6H_{12}O_6$. Viennent ensuite les disaccharides, (association de deux monosaccharides) : principalement le maltose et le saccharose.

Les sucres supérieurs, composés de plus de deux sucres simples, ne représentent en moyenne que 1,5% du miel, mais avec une marge de variation assez importante puisque certains miels peuvent en contenir plus de 8 % (Fanny, 2015).

❖ Eau

La teneur en eau des miels varie entre 14 et 25%. L'optimum se situe autour de 17%, car un miel trop épais est difficile à extraire et à conditionner, tandis qu'un miel trop liquide riche en eau risque de fermenter (Rossant, 2011).

❖ Acides aminés et protéines

Ils sont présents en faible quantité dans le miel (0,26%) et la teneur en azote est négligeable, de l'ordre de 0,041%. Il s'agit essentiellement de peptones, d'albumines, de globulines et de nucléoprotéines qui proviennent soit de la plante (nectars, grains de pollen), soit des sécrétions de l'abeille. Il y a également des traces d'acides aminés comme la proline, la trypsine, l'histidine, l'alanine, la glycine, la méthionine, etc. La proline est le plus abondant des acides aminés du miel. La quantité de proline donne une indication sur la qualité du miel, et elle ne doit pas être inférieure à 183 mg/ kg (Meda A. *et al.*, 2005).

❖ Pigments

On peut citer principalement les caroténoïdes et les flavonoïdes. Ils sont responsables de la coloration du miel. Les flavonoïdes qui appartiennent aux groupes des polyphénols possèdent des propriétés anti-oxydantes très intéressantes, car ils participent à la neutralisation des radicaux libres de l'organisme. La quantité et le type de flavonoïdes varient selon la source florale. En règle générale, plus les miels sont foncés (comme ceux issus du tournesol, du sarrasin et de miellat), plus ils sont riches en flavonoïdes. Parmi les flavonoïdes retrouvés dans le miel, on peut citer : la pinocembrine, la pinobanskine, la chrysin, la galangine, la quercétine, la lutéoline et la kaempférol (Rossant, 2011).

❖ Enzymes

Les principales enzymes du miel sont : les α et β amylases et la saccharase. Elles proviennent de deux origines : végétale et animale. Le nectar contient des enzymes produites par les nectaires de la plante, les abeilles y ajoutent des enzymes de leurs glandes salivaires. Les enzymes du miel sont détruites par la chaleur et leur présence ou leur absence peut servir d'indication de surchauffage du miel (Rossant, 2011).

❖ Vitamines

Le miel contient plusieurs vitamines telles que la thiamine, la riboflavine, la pyridoxine, l'acide ascorbique, l'acide pantothénique, l'acide folique et l'acide nicotinique (Berhateet *al.*,2003 ; Jean-prost et Médori, 2005).

3 - Propriétés physicochimiques et biologiques du miel

Les propriétés physicochimiques et biologiques sont importantes pour bien différencier les miels les uns des autres mais également pour évaluer la qualité de ceux-ci (Louveau, 1985).

3-1 Propriétés physicochimiques

- **La viscosité :** la viscosité se définit comme la résistance à l'écoulement d'une substance. Dans le cas du miel, elle dépend de sa teneur en eau, de sa composition chimique et de sa température. La plupart des miels se comportent comme des liquides newtoniens (il n'y a pas de résistance à l'écoulement) ; toutefois, il existe des exceptions notamment pour certains miels qui ont une composition particulière. (Rossant, 2011).
- **Le pH et acidité:** le miel est acide ; son pH est généralement compris entre 3,2 et 5,5. Le pH du miel est en fonction de la quantité d'acides ionisables, qu'il renferme ainsi que de sa composition minérale (Bogdanov et *al.*,2004).
- **Indice de réfraction :** l'indice de réfraction du miel est inversement proportionnel à sa teneur en eau et de la température. Sa mesure au moyen du réfractomètre constitue la méthode la plus rapide et l'une des plus sûres pour évaluer la teneur en eau des miels (Terrab, 2004).
- **Humidité :** la teneur en eau des nectars et miellats varient suivant leurs origines botaniques allant de l'extrêmement sec au très humide, en effet les abeilles préfèrent les sources les plus concentrés en sucres, ou les moins riches en eau (Avisse, 2014).
- **Coloration :** la coloration est une caractéristique physique importante des miels car elle est en rapport avec leur origine florale et avec leur composition chimique. Elle est extrêmement variable puisque les plus clairs sont presque incolores alors que les foncés sont pratiquement noirs. Entre ces deux extrêmes, on trouve toute la gamme des jaunes et des roux. Parmi les substances responsables de la coloration des miels on trouve bien le carotène et les flavonoïdes (Louveau, 1985).

3-2 Propriétés biologiques

Le miel est non seulement un aliment mais on peut le considérer comme un médicament car il possède maintes propriétés biologiques (Lobreau-callen *et al.*, 1999).

❖ Propriétés nutritionnelles

Le miel est un aliment glucidique à haute valeur énergétique (320 calories par 100 g de miel) assimilable par l'organisme et connu pour sa haute teneur en glucose et fructose (Gonnet, 1982).

❖ Propriétés antioxydantes

Le terme de stress oxydatif décrit le manque d'équilibre entre la production de radicaux libres et l'activité antioxydante dans un organisme. La diminution du stress oxydatif prévient l'apparition des maladies chroniques. La modification oxydative des lipoprotéines est considérée comme un facteur important à l'apparition d'athérosclérose. On a trouvé que le miel contenait une importante activité antioxydante, incluant la glucose oxydase, la catalase, l'acide ascorbique, les flavonoïdes, les acides phénoliques, les acides organiques, les acides aminés, les protéines, et les carotènes. L'activité antioxydante des polyphénols du miel a été mesurée *in vitro*. Il y a une forte corrélation entre l'activité antioxydante et la concentration en phénols et l'inhibition de l'oxydation *in vitro* de la lipoprotéine de sérum humain. De nombreuses recherches ont confirmé que la composition du miel et ses capacités antioxydantes dépendent de nombreux facteurs, comme la source florale du nectar butiné, la saison, et les facteurs environnementaux comme le type de sol, le climat, certains facteurs génétiques, la méthode employée. L'activité antioxydante est due en grande partie aux composés phénoliques et aux flavonoïdes, mais leur mécanisme d'action est encore inconnu (Fanny, 2015).

❖ Propriétés anti-inflammatoires

Les flavonoïdes jouent un rôle principal dans l'inflammation. En effet, ils inhibent la synthèse des prostaglandines, ainsi que la prolifération des lymphocytes B et T. De ce fait, ces derniers ont la faculté d'inhiber l'action de protéines kinases (protéines kinases C ou encore protéine tyrosine kinase) (Cuvillie, 2015).

❖ Propriétés antibactériennes

Les bactéries se nourrissent en priorité de miel plutôt que des lésions nécrotiques, ce qui entraîne une acidification du milieu par la synthèse d'acide lactique. Grâce à cette acidité, le miel inhibe la croissance des bactéries photogènes qui provoquent des surinfections. Le miel a un effet osmotique grâce à sa forte teneur en sucre qui permettra la déshydratation des bactéries et aussi supprimera un élément capital pour le développement et l'activité des bactéries (Cuvillie, 2015).

4- Composés responsables de l'activité antioxydante du miel

Avec la demande croissante d'approvisionnement en antioxydants dans les aliments, le miel est devenu populaire en tant que source d'antioxydant (Abeshu et Geleta, 2016). tels que :

- ❖ **Flavonoïdes** : qui appartiennent au groupe des polyphénols. Ils sont reconnus par leur activité antioxydante, et confèrent au miel des propriétés protectrices vis-à-vis des radicaux oxygénés (Cuvillie, 2015).
- ❖ **Composés phénoliques** : font partie des principaux composants responsables de cette activité antioxydante. Ce sont des antioxydants primaires ou antiradicalaires qui inhibent la propagation des réactions radicalaires en fournissant des hydrogènes aux radicaux libres présents. (Lachman *et al.*, 2010).
- ❖ **Vitamine C** : C'est le piègeur des radicaux libres. Elle se transforme en radicale ascorbyle au contact avec les radicaux libres, stoppant ainsi la réaction radicalaire en chaîne. En application topique, elle diminue considérablement les dommages causés par les rayons UV (Martini et Seiller, 2006).
- ❖ **Caroténoïdes** : Sont des puissants antioxydants capables de protéger nos cellules contre les attaques des radicaux libres et d'exercer ainsi une action préventive contre certain nombre de maladies dégénératives (Lachman *et al.*, 2010).

5- Critères de la qualité du miel

Un miel de qualité doit être un produit sain, extrait dans des bonnes conditions d'hygiène, conditionné correctement pour conserver ces propriétés originales le plus longtemps possible (Schweitzer, 2004).

Pour avoir un miel de bonne qualité il faut que :

- ❖ Le miel ne doit pas avoir de matière, de goût, d'arôme ou de contamination inacceptable provenant de matières étrangères absorbées durant sa formation et son entreposage.
- ❖ Le miel ne doit pas être chauffé ou transformé à un point qui va changer sa composition essentielle et sa qualité.
- ❖ Le miel ne doit pas avoir commencé à fermenter ou être effervescent.
- ❖ Le miel doit être stocké dans des contenants étanches à l'air et l'eau.
- ❖ Réaliser les différentes étapes d'extraction et de préparation du miel dans des locaux non humides.
- ❖ Contrôler la teneur en eau au réfractomètre avant d'extraire (réaliser trois mesures différentes sur les cadres à extraire). Il est préférable d'extraire le miel dont la teneur en eau est égale ou inférieure à 18 % pour éviter sa fermentation (Codex standard, 1981).

Partie pratique

I-Matériel et méthodes

1- Formulation de la margarine

La fabrication des 5 échantillons de margarine est réalisée dans un laboratoire au niveau de l'entreprise COGB Labelle. La margarine est additionnée du miel de différentes doses croissantes et de l'arôme du citron (tableau IV). Les échantillons de margarine qui ont été préparés sont composés essentiellement de deux phases qui sont la phase grasse (82%) et la phase aqueuse (16%), qui contient aussi des additifs alimentaires (2%). L'arôme du citron est ajouté à la margarine élaborée dans le but d'améliorer ses caractéristiques organoleptique telles que le goût et l'odeur. Après préparation des deux phases et leurs ingrédients, la phase grasse est versée dans un récipient inoxydable, puis la phase aqueuse est additionnée tout doucement au récipient à une température de (80°C) pendant 10 à 15 secondes afin d'avoir une bonne émulsion, puis le mélange est refroidi à 45°C. L'émulsion est réalisée à l'aide d'un agitateur (battant) qui permet d'obtenir un mélange homogène. Le mélange a subi une cristallisation et un malaxage qui sont réalisés dans un plateau à glace à l'aide d'une spatule et d'un mixeur pour obtenir une margarine homogène et de bonne texture. La margarine obtenue est conditionnée dans des barquettes de 250 g et est stockée au réfrigérateur à une température de (5 à 6 °C).

Tableau IV : Les échantillons de margarine élaborée en fonction des différentes quantités de miel ajoutées.

Echantillon	M0	M1	M2	M3	M4	M5
La quantité de miel en (g)	Sans miel, sans arôme de citron et sans vitamine E	0,5	1	2	3	Sans miel, sans arôme de citron, avec vitamine E

2- Analyses physico- chimiques effectuées sur la margarine

Les analyses physico- chimiques réalisées sur la margarine élaborée, ont pour objectif de vérifier sa qualité et sa conformité aux mesures.

Matériel et méthodes

2-1 Détermination de l'indice de peroxyde (ISO 3960).

Principe

C'est le traitement d'une prise d'essai, en solution dans l'acide acétique et du chloroforme par une solution d'iodure de potassium (KI). Titrage de l'iode libéré par une solution dethiosulfate de sodium.

Mode opératoire

- Peser 5g de l'échantillon de margarine dans une fiole conique.
- Ajouter à la prise d'essai 25 ml du mélange acide acétique, chloroforme dans la proportion 3/2 volumes respectivement.
- Agiter jusqu'à ce que la margarine soit complètement fondue.
- Ajouter 1 ml d'iodure de potassium (KI).
- Boucher la fiole, puis agiter pendant une minute et mettre à l'abri de la lumière pendant 5 minutes (pour éviter l'oxydation par O₂ de l'air).
- Ajouter 75 ml d'eau distillée pour arrêter la réaction) et quelques gouttes d'empois d'amidon comme indicateur coloré.
- Titrer avec une solution de thiosulfate de sodium (0,01N).
- Réaliser un essai à blanc (sans margarine).

Expression des résultats

Les résultats sont exprimés par.

$$IP = (V - V_0) \cdot N / M \cdot 1000$$

Dont :

Ip : indice de peroxyde exprimé en meq.g O₂/kg.

V : volume du Na₂ S₂O₃ de la chute de burette utilisé pour le titrage.

V₀ : volume de Na₂ S₂O₃ utilisé pour l'essai à blanc.

M : masse de prise d'essai en g.

N : normalité du Na₂ S₂O₃ utilisé pour le titrage (0,01 N).

2-2 Détermination du point de fusion (ISO 63 21, 2002)

Principe

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

Matériel et méthodes

Mode opératoire

- Après avoir fait fondu une quantité de margarine, on obtient un blend qui est filtré puis introduit dans deux tubes capillaires en verre sur une hauteur de 1 cm, les refroidir au réfrigérateur (8 à 10 min)
- Fixer les deux capillaires à une pince en bois
- La pince est suspendue sur les côtés du bécher et les deux capillaires sont immergés dans l'eau osmosée, ensuite le milieu est chauffé lentement (0.5°C/min) dans un bain marie
- Observer attentivement et noter la température à laquelle les colonnes d'huile commencent à remonter dans les tubes.

2-3 Détermination de l'acidité « ISO.1.2.97-1998 »

Principe

Traitement d'une prise d'essai de la margarine/huile par un mélange d'éthanol et d'oxyde diéthylénique, puis titrage d'acides gras libres présents à l'aide d'une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium.

Mode opératoire

- Peser environ 10 g de la margarine dans un bécher
- Ajouter 50ml d'éthanol préalablement neutralisé pour provoquer la dissociation de la matière grasse
- Ajouter quelques gouttes d'indicateur coloré (phénolphthaléine)
- Titrer à l'aide d'une solution d'hydroxyde de potassium jusqu'à apparition d'une coloration rose pâle persistante pendant 10 secondes environ en présence de quelques gouttes de phénolphthaléine

Expression de résultats

$$A(\%) = \frac{N \cdot V \cdot Eqg(\text{acide oléique})}{100 \cdot P} \cdot 100$$

A% : acidité exprimée en pourcentage

N : normalité du KOH utilisé (0,1N)

V : volume du KOH utilisé

Eq .g : équivalent gramme de l'acide oléique (282 g/mole)

Matériel et méthodes

P : prise d'essai en gramme (g).

2-4 Détermination de la teneur en eau (humidité) : «ISO 662, 1998 ».

Principe

Il consiste à provoquer le départ d'eau par l'introduction d'une quantité connue d'huile dans une étuve maintenue à la température de 105° C pendant 30 minutes.

Mode opératoire

- ✓ Peser le bécher à vide (p1) et le poids de la prise d'essai (p2).
- ✓ Déposer sur une plaque chauffante, en agitant soigneusement de temps en temps afin d'éviter la formation d'éclaboussures et gouttelette d'eau aux parois du bécher.
- ✓ Laisser refroidir dans le dessiccateur.
- ✓ Peser le bécher contenant l'échantillon, soit un poids (P).

Expression des résultats :

La teneur en eau est déterminée par la formule suivant :

$$H\% = (P0+P1) - P \cdot 100 / p$$

Dont :

H% : humidité exprimée en pourcentage massique.

P1 : poids du bécher vide en gramme.

P2 : poids de la prise d'essai en gramme.

P : poids de bécher contenant l'échantillon après chauffage.

2-5 Détermination de la teneur en sel (NE.1.2.429/89)

Principe

Consiste à titrer les chlorures contenus dans la prise d'essai, par une solution de nitrates d'argent (AgNO₃) et en présence d'indicateur coloré (chromate de potassium

Mode opératoire

- Peser 5g de l'échantillon dans un Erlenmeyer
- Ajouter 100ml d'eau distillé préalablement chauffée
- Agiter l'eau distillée chauffée et la margarine puis laisser refroidir
- Ajouter quelques gouttes de chromates de potassium

Matériel et méthodes

- Titrer avec la solution de nitrates d'argent jusqu'au virage de la couleur (obtention d'une couleur rouge brique)

Expression des résultats

Le taux de sel est déterminé par l'équation suivante :

$$Ts (\%) = N.V .Eqg (NaCl). 100/M.1000$$

Où :

Ts : taux ou teneur en sel exprimée en %

N : Normalité d'AgNO₃ (0.1N)

V (ml) : volume en ml d'AgNO₃ utilisé pour le titrage

Eq.g (NaCl) : équivalent grammes d'NaCl égal à 58.5

P: prise d'essai en g.

2-6 Détermination du taux de solide par SFC (solid Fat Content) (ISO 8292, 1995).

Principe

Consiste à déterminer le taux de solides dans la matière grasse à une certaine température, elle est réalisée par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire). Le taux de solide est exprimé en pourcentage, il nous renseigne sur la caractéristique physique qui influence beaucoup les propriétés technologiques et sensorielles des corps gras.

Mode opératoire

Une quantité de margarine est fondue dans un bécher à l'étuve (100°C), puis filtrée à l'aide d'un papier filtre contenant une quantité de sulfate de sodium, à partir de la phase récupérée on procède à l'analyse ; Préparation de 03 tubes, et chacun des trois tubes est mis à différentes températures :

- 15 min à 10°C ; 5 min à 60°C ; 60 min à 0°C (cristallisation du produit).

- 30 min à 5 °C ; 30 min à 10°C, 30 min à 15°C ; 30 min à 20°C, 30 min à 25 °C ; 30 min à 30°C ; 30 min à 35°C ; 30 min à 37°C (fonte du produit).

Les valeurs de SFC sont notées chaque 5 min à des températures différentes. Ensuite on trace la courbe de SFC (%) en fonction de la température (°C).

Expression des résultats

Les résultats sont donnés par le logiciel de l'appareil en pourcentage de solide.

Matériel et méthodes

2-7 Détermination du pH de la phase aqueuse pH: (NE.1.2.430/89)

Principe :

Mesure de la différence de potentiel entre une électrode de verre et une électrode de référence dans la phase aqueuse séparée de la margarine fondue.

Mode opératoire

- Etalonner le pH mètre par l'eau distillée à pH =7
- Introduire les électrodes dans la phase aqueuse à la température de mesure
- Lorsque la lecture devient constante, lire la valeur du pH indiqué par le pH mètre, 0,01 unités, sur l'échelle de l'instrument.

3- Antioxydant et activité antioxydante du miel

3-1 Préparation de la solution du miel

La préparation de solution du miel est basée sur la pesée de 2g de l'échantillon du miel dans un bécher, avec l'ajout de 10 ml d'eau distillé, puis faire agiter le mélange à l'aide d'un agitateur.

3-2 Composé phénoliques

La teneur en composés phénoliques est évaluée selon la méthode décrite par Naithani *et al.*, (2006). 100 µl de la solution du miel (0,1 g/ml) sont additionnés, 100 µl du réactif du Folin-Ciocalteu (1/10) et de 2,2 ml de carbonate de sodium (2 %). Après incubation 30 min à l'obscurité, l'absorbance est lue à 720 nm. Les teneurs en composés phénoliques sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage (Annexe III, figure 2) réalisée avec l'acide gallique, les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par 100 g de miel (mgEAG / 100 g).

3-3 Flavonoïdes

Le principe de la méthode de dosage des flavonoïdes se traduit par la formation d'un complexe flavonoïdes-métaux tel que l'aluminium qui est utilisé sous sa forme de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) qui forme des complexes jaunâtres avec les atomes d'oxygènes présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes (Arvouet-Grand *et al.*, 1994).

0,8 ml de la solution du miel est mélangé avec 0,8 ml d'aluminium méthanolique de chlorure d'aluminium (2%). Le mélange est incubé à l'obscurité pendant 30 min à température ambiante, avant de lire l'absorbance à 415 nm. Les concentrations en

Matériel et méthodes

flavonoïdes sont estimées en se référant à la courbe d'étalonnage (Annexe III, figure 1); les résultats sont exprimés en mg équivalent quercétine par 100 g de miel (mg EQ /100 g).

3-4 Pouvoir antiradicalaire

La détermination du pouvoir antiradicalaire est basée sur la diminution de l'absorbance à 517 nm quand le radical libre 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH), réagit avec un antioxydant (Meda *et al.*, 2005).

0,1ml de solution du miel est mélangé avec 1ml de la solution DPPH. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min avant de lire l'absorbance à 517 nm. L'activité antiradicalaire est

estimé en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique comme standard.

Expression des résultats :

$$\% \text{ IP} = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}) \times 100}{\text{Abs contrôle}}$$

%IP : pourcentage d'inhibition.

Abs : absorbance du contrôle (ne contenant aucun antioxydant) après 30 min.

Abs : absorbance d'échantillon mesuré après 30 min.

II-Résultats et discussion

1-Résultats des analyses physico-chimiques effectuées sur la margarine.

1-1 Indice de peroxyde

L'indice de peroxyde est un critère très utile pour apprécier les premières étapes d'une détérioration oxydative (Karleskind et Wolff, 1992). Il permet d'évaluer le degré d'oxydation des acides gras insaturés de la matière grasse (rancissement) plus celui-ci est élevé plus la matière grasse (margarine) est oxydée (Himed et Barkat, 2014).

Les résultats de la détermination de l'indice de peroxyde en fonction du temps pour les six échantillons de margarine sont illustrés dans la figure 3.

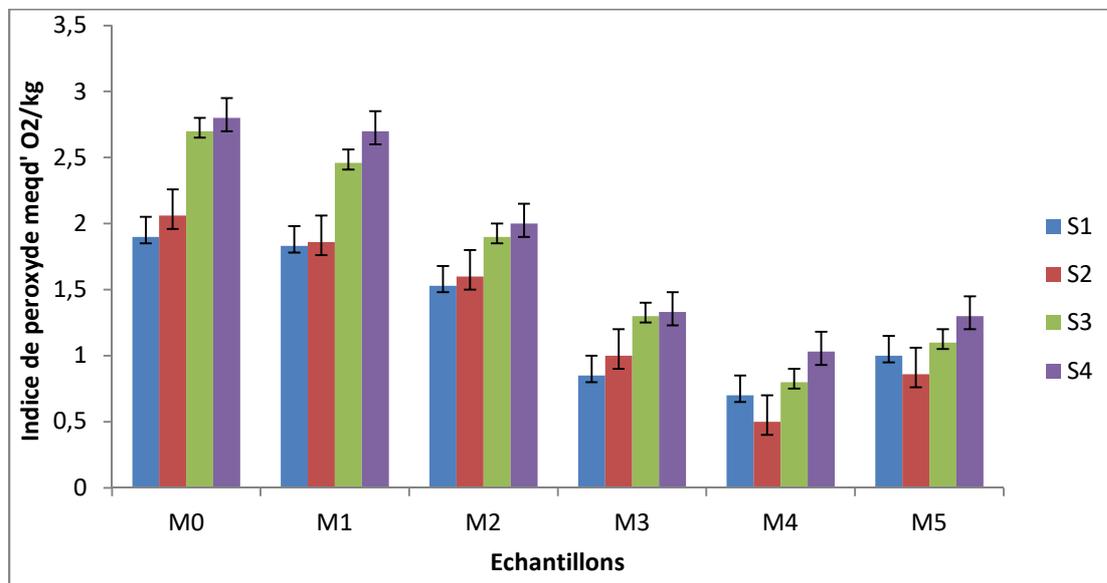


Figure 3 : Indice de peroxyde pour les six échantillons de la margarine.

Les résultats obtenus pour la première semaine montrent que l'indice de peroxyde varie d'un échantillon à un autre. Pour les échantillons M0, M1, M2 les indices de peroxyde sont élevés, ils atteignent jusqu'à 2 meqd'O₂/kg, le taux le plus élevé est celui de l'échantillon M0. Les échantillons M3 et M4 possèdent des indices de peroxyde faibles, cela confirme que les échantillons M3 et M4 résistent mieux à l'oxydation. D'après les résultats obtenus pour la deuxième semaine, on constate que cet indice augmente, mais on note toujours que ce sont les échantillons M3 et M4 qui résistent mieux à l'oxydation. Les résultats obtenus pour la troisième semaine révèlent qu'il y'a une augmentation pour cet indice particulièrement pour M0, M1 et M2, qui atteignent jusqu'à 3 meqd'O₂/kg, par contre l'oxydation dans les

échantillons M 3 et M4 reste toujours faible (cette augmentation due aux mauvaises conditions de stockage). D'après les résultats obtenus pour la quatrième semaine nous remarquons qu'il y'a une stabilité pour l'indice de peroxyde.

Malgré l'augmentation des valeurs de l'indice de peroxyde observée au cours du temps, elles restent toujours inférieures à 10 meqd'O₂/kg qui est la norme maximale de l'entreprise. Par comparaison de l'efficacité de résistance à l'oxydation et de l'activité antioxydante relative, nous pouvons mettre en ordre croissant l'effet antioxydant du miel incorporé dans la margarine élaborée comme suit :

M0 est très sensible à l'oxydation car il est dépourvue de l'antioxydant, puis M1, puis M2, et après M3, et enfin M4 qui résiste mieux à l'oxydation.

D'après cette étude on constate qu' à chaque fois qu'on augmente la quantité du miel (antioxydant) qui est incorporé dans la margarine, il y aura une résistance meilleure à l'oxydation.

1-2 Point de fusion

Le point de fusion est basé sur le passage de la matière grasse de l'état solide à l'état liquide sous l'effet de la chaleur (Wolff, 1968).

Les résultats de la détermination du point de fusion des échantillons M4 et M5 sont illustrés dans la figure 4.

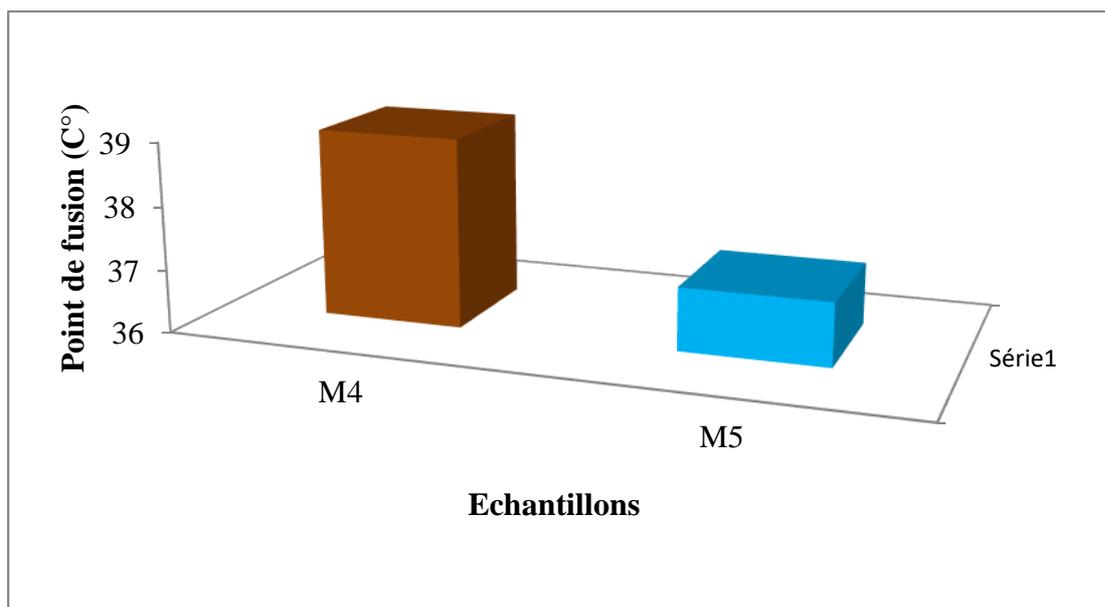


Figure 4: Point de fusion des échantillons M4 et M5

D'après les résultats obtenus, les points de fusion des deux échantillons sont différents. L'échantillon M4 fond à la température de 39°C alors que l'échantillon M5 (témoin) fond à température de 37°C. Cette différence du point de fusion peut être attribuée au fait que la matière grasse (blend) de l'échantillon M4 n'est pas bien homogénéisée par rapport à l'échantillon M5. Il est à noter aussi que le point de fusion varie selon la composition en matière grasse utilisée.

1-3 Acidité(%)

L'acidité d'un corps gras ne doit pas dépasser 0,2%, car elle provoque son altération par hydrolyse (Karleskind, 1992).

Les résultats de la détermination de l'acidité en fonction du temps pour les six échantillons de margarine sont illustrés dans la figure 5.

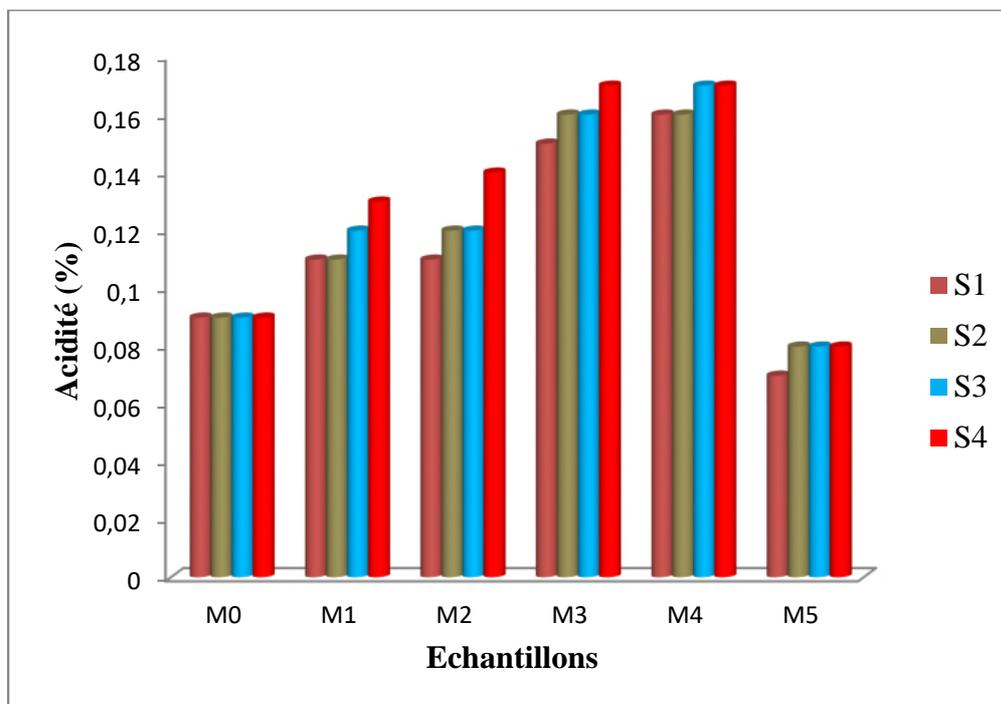


Figure 5 : Taux d'acidité pour les six échantillons de margarine

D'après les résultats obtenus nous remarquons que l'acidité augmente légèrement au cours du temps pour les échantillons (M1, M2, M3 et M4,) par rapport aux échantillons (M0 et M5), cette augmentation due à l'ajout du miel. Le miel contient plusieurs acides tel que l'acide gluconique qui est un dérivé de glucose et qui est le principale composé responsable de l'acidité du miel (Bogdanov *et al.*, 2004)

Pour les échantillons M0 et M5, nous remarquons que leur acidité est stable au cours du temps car ils sont dépourvus du miel. Malgré cette augmentation, l'acidité des échantillons de margarine est toujours conforme à la norme la ($\leq 0,2\%$) de l'entreprise.

1-4 Humidité(%)

Les résultats de la détermination de l'humidité pour les six échantillons de margarine sont présentés dans le tableau V.

Tableau V : Taux d'humidité pour les six échantillons de margarine.

Echantillons	M0	M1	M2	M3	M4	M5
Humidité (%)	16,12	14,82	15,47	15,52	15,90	16,30

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que le taux d'humidité des six échantillons de margarine est conforme à la norme, dont la teneur est fixée au maximum 18%(ISO 662, 1998).La conformité de ces résultats est due à la bonne dispersion d'eau dans la phase grasse de la margarine.

1-5 Taux de sel

Les résultats de la détermination de la teneur en sel pour les six échantillons sont illustrés dans la figure 6.

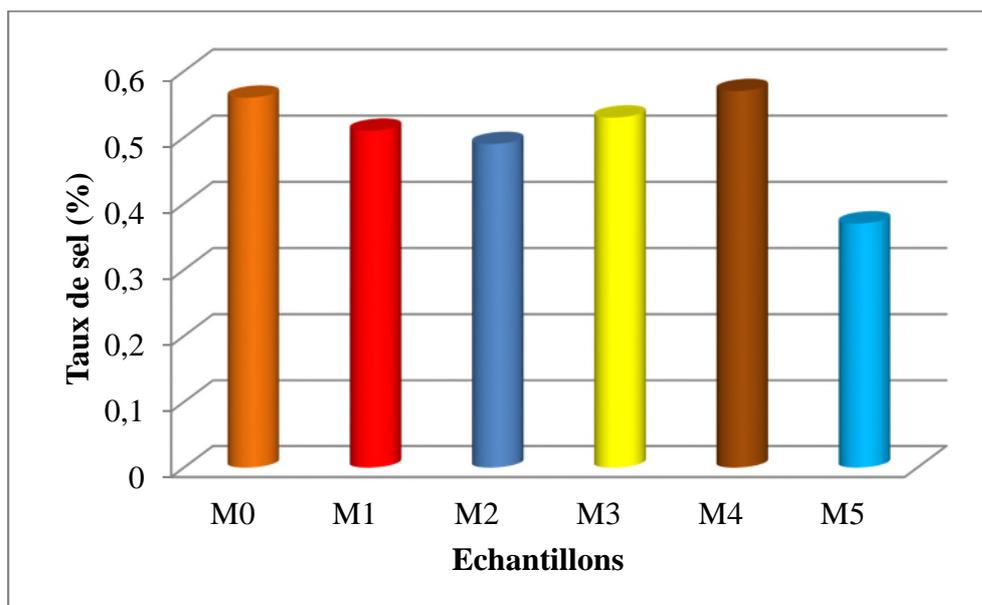


Figure 6 : Taux de sel pour les six échantillons de margarine.

L'ajout du sel à la margarine est nécessaire dans le but d'améliorer les caractéristiques organoleptiques telle que la sapidité à la consommation, c'est aussi un élément important qui permet d'empêcher le développement de certaines bactéries et de prolonger la durée de conservation des aliments (Sededio, 2007).

Les résultats obtenus révèlent que les teneurs en sel des échantillons M0, M1, M2, M3, M4 sont supérieures à la norme de *codex alimentarius* (0,1% à 0,4%). Cette augmentation est due à l'excès de quantité du sel qui est ajoutée à la phase aqueuse.

1-6 Taux de solide

Les résultats de la détermination du taux de solide pour les échantillons de margarine M0 et M2 sont illustrés dans la figure 7

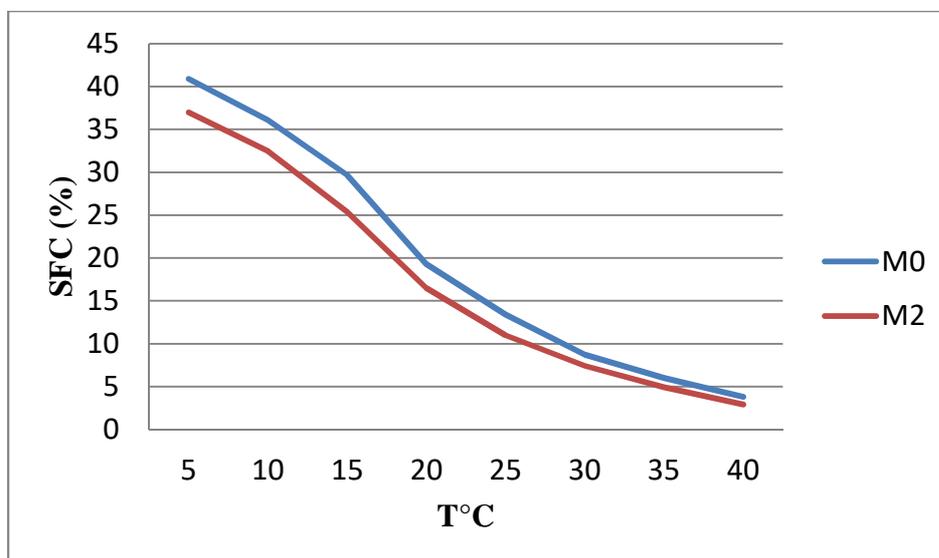


Figure 7 : Taux de solides SFC (solid fat content) pour les deux échantillons de margarine (M0 et M2).

La teneur en solide est une mesure de la quantité de graisse à l'état solide dans la margarine à une certaine température. Elle est déterminée par RMN (Graille, 2003). La connaissance du SFC d'un mélange de matières grasses est extrêmement importante pour concevoir et prévoir les performances du mélange en termes de fermeté et de propriétés de fusion, il est responsable de plusieurs caractéristiques propres aux margarines incluant leur aspect et apparence, tendance à la tartinabilité, et les propriétés organoleptiques, (Arellano et al., 2015).

Les résultats de RMN montrent que les taux de solides diminuent en fonction de la température, ces résultats montrent que les échantillons de margarine étudiés M0 et M2 présentent des taux de solides bien que faibles à 40C.

D'après les résultats obtenus par Chu *et al.*, (2002), dont la teneur est de $(5,47 \pm 0,81\%)$ à 40C°, révèlent que M0 et M2 s'approchent à celle de margarine de table et à tartiner.

1-7 pH de la phase aqueuse

Le pH est un paramètre très important et l'un des principaux facteurs qui détermine pendant la préparation et le stockage de la margarine le suivi et la croissance des microorganismes.

Le pH obtenu de la phase aqueuse de l'échantillon M0 est de 5 et le pH de l'échantillon M5 (témoin) est de 4,5, cette différence est due à l'utilisation de deux phases aqueuse différentes. Selon les deux normes maximales et minimales préconisées par l'entreprise (3,5 à 5), on constate que les pH des phases aqueuses des deux échantillons sont conformes aux normes de l'entreprise.

Le contrôle de qualité de l'eau, des conservateurs, des correcteurs de pH utilisés, ainsi que la maîtrise de leurs quantités ajoutées rendent le pH de la margarine conforme à la norme.

2-Antioxydants et activité antioxydante du miel

2-1 Teneurs en composés phénoliques et flavonoïdes

Le taux des polyphénols totaux donne une estimation globale de la teneur en différentes classes des composés phénoliques contenus au niveau des échantillons analysés (Pawlowska *et al.*, 2006).

La concentration en polyphénols totaux dans le miel étudié est de $100,38 \pm 0,81$ mgEAG /100g. Cette valeur est proche de celle obtenue par Doukani *et al.*, (2014) ($100,57$ mgEAG/100g), et inférieure à celles obtenues pour quelques miels algériens analysés par Mouhoubi – Tafinine *et al.*, (2016) qui varient entre 171,72 à 5351,22 mgEAG /100g. Cette différence est due à l'origine florale et provenance géographique du miel.

La teneur en flavonoïdes du miel étudié est de $24,65 \pm 4,62$ mgEQ/100g. Buneno *et al.*, (2016) ont trouvés des valeurs qui varient entre 2,98 et 10,46 mgEQ/100g. Kadri *et al.*

al.,(2016) en analysant des échantillons du miel rapportent des valeurs qui varient de $3,30\pm 0,19$ à $3,63\pm 0,20$ mgEQ/100g.

Ces résultats sont inférieurs au résultat obtenu dans la présente étude, la variabilité des résultats rapportées par les auteurs peut être attribuée à plusieurs facteurs tels que ; l'origine florale, la situation géographiques aussi bien que le climat (Sladana *et al.*,2011). Plusieurs auteurs ont signalé que les miels les plus colorés sont plus riches en flavonoïdes que les miels de couleur clair(Doukani, 2014).

2-2 Pouvoir antiradicalaire de DPPH

Le radical DPPH est l'un des substrats les plus utilisés généralement pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale et la simplicité de l'analyse. L'activité antioxydante est déterminée par la diminution de l'absorbance d'une solution alcoolique de DPPH à 515 nm (Doukani, 2014). En présence d'extrait du miel, le pourcentage d'inhibition du radical DPPH pour l'échantillon du miel est de 26,97 %. Cette inhibition est supérieure à celles obtenues par Doukani, (2014) qui varient entre (3,42 et 22,06)% sur les échantillons du miel.

Le pouvoir antioxydant du miel peut être attribué à sa richesse en substances antioxydantes telles que les polyphénols, flavonoïdes, vitamine C, etc. Les composés phénoliques sont les principaux facteurs responsables des activités antioxydantes. Généralement, une activité antioxydante plus élevée est trouvée dans les échantillons de miel foncé et les variations dans les activités antioxydantes de miels sont dues à la nature quantitative et qualitative de leur contenu phénolique (Doukani, 2014). Les flavonoïdes sont généralement de puissants antioxydants, certains de ces composés présentent en effet une activité antioxydante jusqu'à 200 fois supérieure à celle de la vitamine E (Heller *et al.*, 1998).

Conclusion

Conclusion

Le présent travail consiste à évaluer la qualité d'une margarine enrichie avec le miel élaborée au niveau de l'entreprise COGB la belle. Des analyses physico-chimiques et particulièrement l'indice de peroxyde qui intervient dans le suivi de la stabilité de notre produit, sont effectués sur les six échantillons de la margarine (M0, M1, M2, M3, M4, M5) dans le but de savoir l'échantillon qui résiste mieux à l'oxydation au cours du stockage.

En outre, les analyses effectuées (dosage des flavonoïdes, dosage des polyphénols totaux et l'activité antioxydante) sur le miel qu'on a incorporé dans la margarine, montrent qu'il est très riche en polyphénols dont la concentration est de $(100,38 \pm 0,81 \text{ mgEAG} / 100\text{g})$ et qui sont des principaux composés responsables de l'activité antioxydante du miel.

Les résultats des analyses physico-chimiques effectuées sur la margarine révèlent une conformité par rapport aux normes fixées par l'entreprise, sauf le taux de sel qui est supérieur à la norme, ce qui est probablement dû au matériel de dosage défaillant, ou au mauvais dosage de sel dans la phase aqueuse. Le sel joue un rôle important dans la stabilisation de l'émulsion, mais il est nécessaire de contrôler et de respecter sa quantité à ajouter, car à forte dose, la margarine devient trop salé et sa consommation à cet état provoque l'hypertension.

Afin d'assurer un produit sain et de bonne qualité du point de vue nutritionnel et hygiénique, il est nécessaire de respecter les bonnes pratiques de fabrication et d'hygiène.

En guise de perspectives, il serait intéressant de :

- Effectuer un test de Rancimat qui évalue la stabilité oxydative de la margarine et ainsi sa durée de conservation.
- Faire une évaluation sensorielle de la margarine élaborée.
- Réaliser des tests rhéologiques complémentaires par texturométrie et rhéomètre, nécessaire pour l'appréciation de la texture.
- Enfin additionner un élément capable de moduler le taux de sel dans le cas de son hyper-quantité.

Références bibliographiques

Alais C. et Linden G. 1997. Corps gras. In : Abrégé de biochimie alimentaire. Edition Masson. Paris, France. PP. 119-123.

Arellano M. Norton I.T. Smith P. 2015, Specialty oils and fats in margarines and low-fat spreads. Edition University of Birmingham: 248.

Avisse I. 2014. Grand traite des miels. Edition le sureau. Paris, France

Acem K. 2016. Technologie des corps gras alimentaires. Edition Universitaireseuropéennes. PP. 42-45.

Branen A. 1975, Toxicology and biochemistry of butylatedhydroxyanisole and butylated hydroxytoluen . Journal of the American chimists Society, 52: 248.

Bogdanov S., Bieri K., Figar M., Figueiredo V., Iff D., Kanzig A., Stockli H. Zurcher K. 1995. Miel: Definition et directives pour l'analyse et l'appréciation. Edition Centre Suisse de recherche. PP. 1-26.

Botteweck A. Verhagen H. Goldbohm R. Kleinjans J, Van den Brandt P. 2000, Intake of butylated hydroxyanisol and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. Food and chemical toxicology. Edition Elsevier, 38: 599-605.

Bogdanov S., Kanzing A., Frey T., Iff D. 2004. Manuel des denrées alimentaires. Edition MSDA. PP. 1-39.

Becker L., Bendouma M., Bonnart A., Bousquière M., Maison M., Mathieu R., Napolitano E., Obaadia E., Pelermo A et Thollet M. 2009. Les aditifs alimentaires. « Le meilleur et le pire » PP. 1-4.

Balas. F. 2015. Les propriétés thérapeutiques du miel et leurs domaines d'application en médecine générale : revue de littérature. Thèse de doctorat en médecine, université de Nice Sophia-Anti Polis, Faculté des médecines. France, 21P

Champtier G. 1956. Les industries des corps gras. Tec&Doc Lavoisier F.75008. Paris. PP. 283-291.

Cross AD. 1968. Manuel d'analyse des corps gras. AZOULAY, Paris, P. 519.

Cheftel J, C. et Cheftel H. 1977, Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Edition Tec &Doc, Lavoisier, Paris, France. P247.

Codex Standard. 1981. *Codex Alimentarius* commission

Clement D,J. et Decker E,A. 2000, Lipid oxidation in oil- in water emulsions, impact of molecular environment of chemical reactions in heterogeneous food systems. In:” Journal of food sciences”, 65 : 1270-1271.

Cossut J. Defrenne B. Desmedt C. Ferrouls .2002, Les corps gras, entre tradition et modernité , procédés de fabrication et contrôle de qualité : Institut agroalimentaire, Lille, France. PP. 27-51.

Cuvillie A. 2015. Miel, propolis, gelée royale : les abeilles alliées de notre système. Immunitaire. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de lille 2, Faculté des sciences pharmaceutiques.

Dickinson E. 1996, Les colloïdes alimentaires. Edition Masson, paris, France : 216P.

Dell' agli M. Busciala A. and Bosisio E. 2004, Vascular effects of wine polyphénols. Cardiovascularresearch. Edition Oxford, 63(4) : 513-602.

Doukani K. 2014, Etude physicochimiques et phytochimique de quelques types de miel algériens. Edition université Ibn Khaldoun Tiaret. Algérie : 44-45.

Eymrd S. 2003. Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chnchard (*TrachurusTrachurus*) choix des procédés. These de doctorat en génie des procédés. Biochimie. Université de Nantes.

Elisabeth V. 2008. Aliments et boissons, Filière et produits, Edition 3. 207P

François R .1974. Margarine. In. Les industries des corps gras. Edition Tec et Doc. Lavoisier, Paris. France. PP. 290-291.

Faur L. 1992. Transformation des corps gras à des fins alimentaires. In : Manuel des corps gras. Edition Tec et Doc. Lavoisier. Paris, France. ISBN: 2-85-206-662-9: PP. 938-984.

Faur L. 1996. Margarine technology oil and fats Manuel. Edition Lavoisier publishing. Paris, France : PP. 938-989.

- Faur L. et Madsen, J. 2002. Industries des corps gras. In : «Additifs et auxiliaire de fabrication dans les industries Agroalimentaire. Edition Tec et Doc, Lavoisier, Paris : PP. 648-654.
- Frankel E. 2005, Lipid oxidation, Bridgewater: Barnes PJ and associates. City: The oily press. Edition unitedkingdom.
- Graille J. 2003. Lipides et corps gras alimentaires: Edition Tec et Doc, Lavoisier. Paris, France: PP. 151-351.
- Genot C., Meynier A et Riaublanc A. 2003. Lipid oxidation in emulsions. In: Lipid oxidation pathways. Edition Champaign: AOCS press. PP. 190-234.
- Himed L. et Barkat M. 2014, Elaboration d'une nouvelle additionnée des huiles essentielles de citrus limon : Oilseds and fats, crops and lipides. 21: 102.
- ISO 622. 1998. Corps gras d'origine animal et végétale : Détermination de la teneur en eau et en matière volatiles. PP. 1-4.
- Judde A. 2004, Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique : mécanismes, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications ? Oléagineux, corps gras, lipides, 11(6) : 414-418.
- Karleskind A. 1992. Manuel des corps gras. Edition Tec & Doc. Paris. Tome I et Tome II. P : 1579.
- Karleskind A., Wolf J.P. 1992. Manuel des corps gras. Edition lavoisier. Paris, France. P. 1579.
- Karleskind A. 1996. Oils and fats manual : a comprehensive treatise : properties, production, applications. Volumes 1 et 2. Edition Lavoisier publishing. Paris, France.
- Labuza T.P et Dugan Jr.L. 1971, Kinetics of lipid oxidation in food. Critical reviews in food. Science et Nutrition, 2(3): 355-405.
- Louveaux J. 1985, Les produits de rucher In : Les abeilles et leur élevage ; Edition : OPIDA. PP. 165-199.
- Lachman J. Orsak M, Hejtmankova A. 2010, Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of Selected Czech honeys. LWT Food Science and Technology, 43: 52-58.

- Min DB. Akouh CC. 1998, Lipid oxidation of edible oil: Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology. Second Edition, Revised and Expanded Dekker. New York, Bâle. 283-296.
- Martin S. Andriantsitohaina R. 2002, Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium, annales de cardiologie et d'angéologie. Edition Masson, Elsevier, France, 51. PP. 304-315.
- Morin O. 2005, Acides gras trans, récent développements, oléagineux, corps gras, lipides. Gaspard monge, 12 : 415-417.
- Meda A. C.E. Romito M. Millogo J. Nacoulma O.G. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in BukinaFasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food chemistry, 91(3): 571-577.
- Martini M. et Seiller M. 2006. Actif et additifs en cosmétologie 3ème édition. Editions Tec et Doc. Paris. France. 1051P.
- Naithani V. Nair S. Kakkar. 2006. Decline in antioxidant capacity of Indian herbal teas during storage and its relation to phenolic content. Food research international, 39(2): 176-181.
- O'Brien R.D. 2009. Fats and oils: Formulating and processing for applications. Edition: CRC Press. 744P.
- Prior E. 2003. Usage des corps gras alimentaires dans les différents secteurs de la technologie alimentaire. Edition. Tec et Doc. Lavoisier. Paris, France, PP. 51-187.
- Rossant A. 2011. Le miel, un composé complexe aux propriétés surprenantes. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Limoges, Faculté de pharmacie. PP. 55-58.PP.
- Codex Standard. 1981. Codex *Alimentarius* commission Standards.
- Schweitzer P. 2004, Les critères de qualité du miel. Revue l'abeille de France N°916 laboratoire d'analyse et d'écologie apicole : 2.
- Sabedio J. 2007, Acides gras trans : nature, origine et impact sur la santé. Cahiers de nutrition et diététique , 42 : 239-245.
- Trémolieres J. Serville Y. Jacquot R. 1980. Manuel d'alimentation humaine. Les bases d'alimentation. Tome I. Edition ESF, Paris, France. PP.143-144.

Terrab A. Recamales A,F. Herranz D. Heredia F,J. 2004, Characterisation of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents; Food chemistry,88: 537-542.

Warner K. Frankel et Mounts TL. 1989, Flavor and oxidative stability of soybean. Journal of the American oil chemist's society, 66: 558-564.

Wolf JP. 1968. Manuel d'analyse des corps gras. Edition AZOULAY, Paris. France. 519P.

Yaiche H &Khali M. 2014, Composition physicochimiques des miels algériens : détermination des éléments traces et des éléments potentiellement toxiques. Revue internationale des sciences et technologies, 10 : 128.

Annexe I : Présentation de l'unité CO.G.B La Belle

L'entreprise nationale des corps gras a été lancée au début du XXème siècle sous le nom de S.I.A.N (Société Industrielle d'Afrique du Nord) commençant par l'extraction de l'huile de grignon d'olive et la fabrication du savon, mais c'est en 1940 qu'a démarré le raffinage de l'huile de colza et de tournesol. En 1974 la naissance de la SO.GE.D.I.A (la société de gestion et développement des industries alimentaires) après la nationalisation de la S.I.A.N. En 1997 la naissance de la CO.G.B (Corps Gras de Bejaia) deux ans plus tard, la CO.G.B a lancé l'unité de production de la margarine (margarine de table, pâtissière et de feuilletage) et le lancement de l'électrolyse et l'hydrogénation en 2005.

En 2006 l'état a cédé 70% des part du complexe CO.G.B pour le groupe La Belle pour devenir enfin CO.G.B LaBelle durant cette même année une chaîne PET a été acquise pour la fabrication d'emballages transparents (5 L) ainsi que la reprise de la fabrication du savon de ménage "la Caille".

Actuellement l'entreprise exerce son activité sous la direction du groupe La Belle depuis sa privatisation totale par le même groupe fin 2009

Produits principaux de la CO.G.B La Belle

- Huile de table (GOUTTE D'OR) de 1L, 2L et 5L.
- Savon de ménage (La caille) et savon de toilette (palme d'or).
- Margarine.
- Produit végétal aromatisé (SOUMAA).
- Graisse végétale aromatisée (SHORTNING).
- Glycérine industrielle

Annexe II : Le Taux d'acidité et le Taux d'humidité en %.**Tableau I : le taux d'acidité en %**

Echantillons	première semaine	deuxième semaine	troisième semaine	quatrième semaine
M0	0,09	0,09	0,09	0,09
M1	0,11	0,11	0,12	0,13
M2	0,11	0,12	0,12	0,14
M3	0,15	0,16	0,16	0,17
M4	0,16	0,16	0,17	0,17
M5	0,07	0,08	0,08	0,08

Tableau II : Taux de sel(%).

Echantillon	Teneur de sel (%)
M0	0,56
M1	0,51
M2	0,49
M3	0,53
M4	0,57
M5	0,37

Annexe III : courbes d'étalonnage.

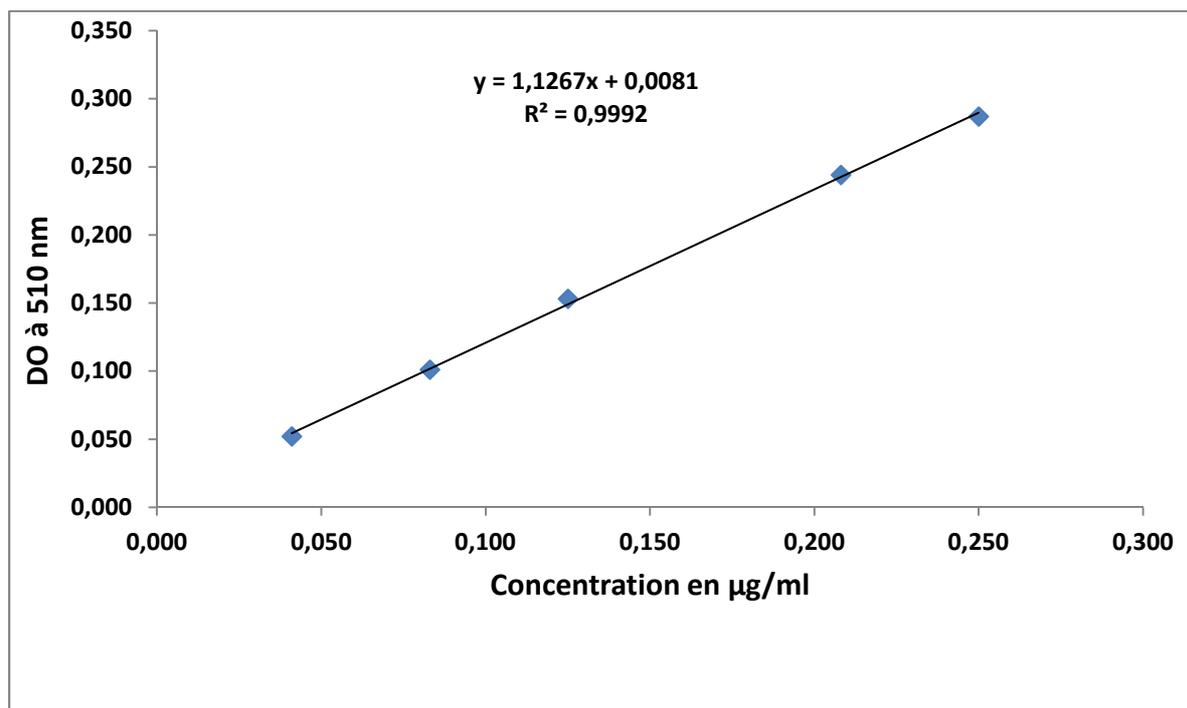


Figure 1 : Courbe d'étalonnage utilisé pour le dosage des flavonoïdes en utilisant la quercétine.

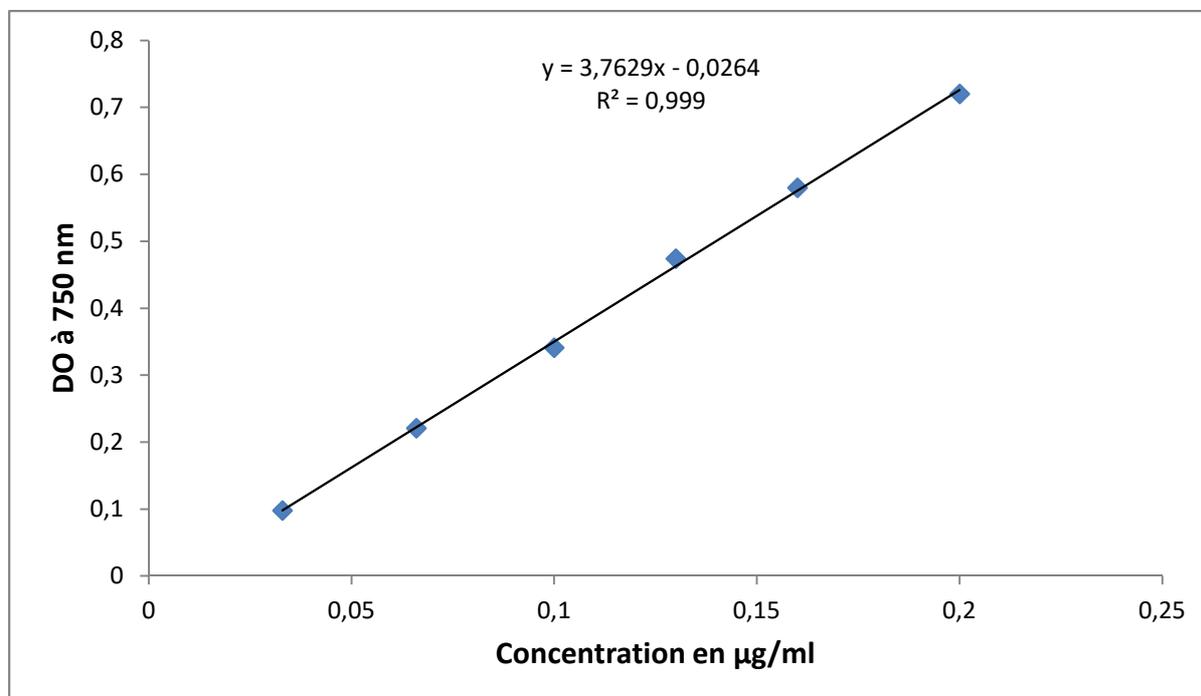


Figure 2 : Courbe d'étalonnage utilisé pour le dosage des composés phénoliques en utilisant l'acide gallique.

Résumé

Le présent travail a pour objectif la formulation d'une margarine enrichie par un extrait naturel qui est le miel. Cette margarine élaborée est dépourvue de la vitamine E qui est un antioxydant utilisé dans la conservation des corps gras (la margarine). Les résultats obtenus pour les analyses physico-chimiques effectuées montrent que les propriétés physico-chimiques des échantillons varient d'un échantillon à un autre. Le miel est une source importante d'antioxydants naturels tels que les composés phénoliques et les flavonoïdes. La margarine élaborée est enrichie du miel dans le but de déterminer son effet antioxydant ainsi que la stabilité de la margarine au cours de son stockage et sa conservation.

Mots clés : Margarine, Composés phénoliques, Flavonoïdes Antioxydants, Conservation, Analyses.

Abstract

The present work aims at the formulation of a margarine enriched by a natural extract which is honey. This margarine is devoid of vitamin E which is an antioxidant used in the preservation of fat (margarine). The results obtained for the physicochemical analyses carried out show that the physicochemical properties of the samples vary from sample to sample. Honey is an important source of natural antioxidants such as phenolic compounds and flavonoids. The elaborate margarine is enriched with honey in order to determine its antioxidant effect as well as the stability of the margarine during its storage and its conservation.

Key words: Margarine, Phenolic compounds, Flavonoids Antioxidants, Preservation, Analyses.