

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Spécialité : Microbiologie Appliquée



Réf :.....

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

MASTER

Thème

**Essai de fabrication de deux jus de bissap
aromatisés naturellement au niveau de
l'unité IFRUIT.**

Présenté par :

HOCINE Samira & IBRICHE Kamilia

Soutenu le : 25 septembre 2021

Devant le jury composé de :

Mr BETTACHE Azzeddine

Professeur Président

Mme TETILI Fatiha

MCB Encadreur

Mme FARADJI Samia

MCA Examinatrice

Année universitaire : 2020 / 2021

Dédicaces

Je dédie entièrement ce travail à mon père et à ma mère, mes piliers, mes exemples, mes premiers supporteurs et ma plus grande force. Merci pour votre présence, votre soutien et surtout votre amour, merci de n'avoir jamais douté de moi.

À mes chères frères et sœurs, qui font de mon univers une merveille, je leurs souhaite beaucoup de bonheur et de réussite.

À la meilleure des sœurs Ouardia, qui depuis des années m'encourage, me comprend et a toujours été à mes côtés, que dieu lui donne du bonheur, santé et réussite.

Enfin je dédie ce travail à mon binôme, amie et compagne de parcours d'études Samira, pour son courage, sa sagesse, sa force et sa sincérité

À tous ceux qui m'aiment... je les remercie tous.

IBRICHE Kamilia

Dédicaces

Je dédie entièrement ce travail à mon père et à ma mère, mes piliers, mes exemples, mes premiers supporteurs et ma plus grande force. Merci pour votre présence, votre soutien et surtout votre amour, merci de n'avoir jamais douté de moi.

À mon cher frère Mouloud et mes sœurs Karima, Sarah, Rezkia et Ouardia qui font de mon univers une merveille, je leurs souhaite beaucoup de bonheur et de réussite.

À Athman mon cher, qui a toujours cru en moi, qui m'a encouragé et toujours à mes côtés et qui m'a donné la force d'aller plus loin.

A tous mes ami(e)s qui m'ont toujours encouragé et à qui je souhaite beaucoup de succès.

Enfin je dédie ce travail à mon binôme, amie et compagne de parcours d'études Kamilia, pour son courage, sa sagesse, sa force, sa sincérité, son effort, sa patience et sa compréhension tout le long de ce travail.

À tous ceux qui m'aiment... je les remercie tous.

HOCINE Samira

Remerciements

*Tout d'abord Nous tenons à remercier **ALLAH** le tout puissant de nous avoir donné la santé, la volonté, le courage et la patience pour mener à terme notre formation et pourvoir réaliser ce travail de recherche.*

*En guise de reconnaissance, nous tenons à remercier, très sincèrement, le Professeur **BETTACHE Azzeddine**, nous avons eu l'honneur et la chance de bénéficier de ses connaissances et compétences et de ses précieux conseils. Son sens élevé du devoir, le fait d'être toujours montré à l'écoute ainsi que sa rigueur scientifique impose l'estime et le respect. Nous vous remercions infiniment.*

*Nos remerciements s'adressent particulièrement à madame **TETILI Fatiha**, pour son encadrement de qualité, sa motivation professionnelle, ses conseils et critiques constructives, ses corrections, sa gentillesse et sa patience ainsi pour le temps qu'elle a consacré à la réalisation de ce travail.*

*Nos remerciements vont également à l'examinatrice madame **FARADJI Samia** qui a acceptée d'évaluer ce travail.*

*Nous remercions vivement les responsables de la SARL **IBRAHIM et FILS «Ifri»** en particules le chef de département qualité Mr **BEKOUCHE Karim**, pour avoir accepté la réalisation de ce travail au sein de leur unité et de mettre à notre disposition tous les moyens, matériels et humains. Nous remercions vivement les ingénieurs de laboratoire Mme **IBRAHIM Nacera**, Mme **MEDJEKDOUD Zakia** et **BETTACHE Zoubida**, avec qui nous avons eu la chance de travailler au laboratoire ainsi que pour leurs accueils chaleureux, leurs gentillesse, leurs patiences et leurs bonnes humeurs générale et tous les membres du service traitement des eaux.*

De peur d'en avoir oublié, je souhaite remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de ce parcours universitaire.

Liste des abréviations

- A** : Acidité.
- Ag⁺**: Ions d'argents.
- AgNO₃**: Nitrate d'argent.
- A_w**: Activité de l'eau.
- BCM**: Bissap Citron Menthe.
- BEA**: Bile Esculine Azoture.
- BF**: Bissap Fraise.
- CSR**: Clostridium Sulfito-Réduteur.
- DRBC**: Dichloran Rose Bengale Chloramphenicol.
- E**: *Escherichia*.
- EDTA**: Éthylène Diamine Tétra Acétique.
- FTAM**: Flore Totale Aérobie Mésophile.
- H**: *Hibiscus*.
- H₂SO₄**: acide sulfurique.
- HDL**: High Density Lipoprotein.
- ISO**: International Organization for Standardization.
- JORA**: Journal Officiel de la République Algérienne.
- K₂CrO₄**: Chromates de potassium.
- LDL**: Low Density Lipoprotein.
- N**: Normalité.
- NET**: Noir Eriochrome T.
- NF**: Norme Française.
- °B**: Degré Brix.
- °F**: Degré Français.
- OH⁻**: Ion hydroxyde.
- P**: *Pseudomonas*.
- PCA**: Plate Count Agar.
- PET**: Poly éthylène téréphtalate.
- pH**: potentiel d'hydrogène.
- SARL**: Société à Responsabilité Limité.
- TA**: Titre Alcalimétrique simple.
- TAC**: Titre Alcalimétrique Complet.
- TH**: Titre hydrométrique.
- TSA**: Trypticase Soy Agar.

TTC: Triphényl Tétrazolium Chlorures.

UFC: Unité Formant Colonie.

VRBL: Violet Red Bile Lactose agar.

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Plante de karkadé	04
02	Types de bissap	04
03	Différentes parties d'une plante adulte de roselle	05
04	diagramme de fabrication de boissons industrielles de bissap	09
05	diagramme de fabrication de boissons traditionnelles de bissap	10
06	Résultats de pH des boissons formulées	26
07	Résultats de l'acidité titrable des boissons formulées	27
08	Résultats de degré Brix des boissons formulées	28

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Classification taxonomique d' <i>H. sabdariffa</i>	03
II	Différentes utilisations alimentaires d' <i>H. sabdariffa</i>	07
III	Les germes recherchés dans les matières premières et la boisson de bissap	18
IV	Analyses microbiologiques de l'eau	20
V	Différents conditions de stockage de la boisson bissap	24
VI	Résultats d'analyses physico-chimiques de l'eau osmosée	25
VII	Résultats d'analyses microbiologiques de l'eau osmosée (process)	29
VIII	Résultats d'analyses microbiologiques des boissons formulées	30
IX	Résultats du test de stabilité durant 21 jours de stockage de deux types de boissons bissap formulées	32

Liste des figures en Annexe 01

Figure 01: L'organisation générale de l'unité IFRUIT.

Liste des tableaux en Annexe 02

Tableau I: Valeurs minimales, moyennes et maximales de différentes caractéristiques des calices d'*H. sabdariffa*.

Tableau II: Les résultats physico-chimiques des boissons finis.

Tableau III: Composition nutritionnelle pour 100 g de menthe fraîche.

Tableau IV: Composition nutritionnelle pour 100 g de fraise crue.

Tableau V: Composition nutritionnelle pour 100 g de jus de citron pur.

Annexe 03

Composition des milieux de cultures.

Sommaire

Introduction	1
--------------------	---

Partie bibliographique

I. Généralités sur la plante *Hibiscus sabdariffa*

I.1 Origine et historique	3
I.2 Classification.....	3
I.3 Définition de la plante	4
I.3.1 Types de bissap.....	4
I.3.2 Appellations.....	5
I.4 Description de la plante	5
I.5 Ecologie	5
I.6 Composition de la plante au niveau des calices	6
I.7 Intérêts nutritionnels.....	6
I.8 Intérêts économiques.....	6
I.9 Principales utilisations	7

II. Généralités sur le jus de bissap

II.1 Définition	8
II.2 Fabrication de jus de bissap.....	8
II.3 Intérêts thérapeutiques de bissap.....	11

Partie pratique

I. Matériel et méthodes

I. Objectif d'étude.....	14
II. Présentation de l'unité de fabrication IFRI «IFRUIT».....	14
III. Ingrédients utilisés pour la fabrication de la boisson.....	15
IV. Fabrication de la boisson bissap.....	16
V. Méthodes et techniques d'analyse.....	16
V.1 Analyses physicochimiques.....	16
V.1.1 Analyses de l'eau de process.....	16
V.1.2 Analyses de boissons bissap.....	17
V.2 Analyses microbiologiques.....	18
V.2.1 Analyses de l'eau de process.....	19
V.2.2 Analyses de boissons bissap.....	22
V.3 Test de stabilité.....	24

II. Résultats et discussion

I. Résultats des analyses physicochimiques.....	25
I.1 Résultats d'analyses de l'eau.....	25
I.2 Résultats d'analyses de bissap fini.....	25
I.2.1 Potentiel d'hydrogène (pH).....	26
I.2.2 Acidité titrable.....	27
I.2.3 Extrait sec soluble (Degré Brix).....	28
II. Résultats des analyses microbiologiques.....	29
II.1 Résultats d'analyses de l'eau.....	29
II.2 Résultats d'analyse de la boisson Bissap.....	29
III. Résultats de la stabilité de deux boissons au cours de stockage.....	31
III.1 Résultats physicochimiques.....	31
III.2 Résultats d'analyses microbiologiques.....	31
III.3 Qualité organoleptique.....	33
Conclusion.....	34

Références bibliographiques

Annexes

INTRODUCTION

Introduction

Les boissons occupent une place importante dans la vie quotidienne de l'Homme. Elles contiennent des éléments nutritifs et autres éléments nécessaires à l'organisme tels que les acides, les sucres, les vitamines les antioxydants... Elles sont fabriquées généralement de façon industrielle mais aussi de façon artisanale (**Konan, 2016**). Elles comprennent les jus de fruits et les boissons non alcoolisées puis les boissons alcoolisées.

Le marché des boissons est en pleine évolution suite à l'augmentation de nombre d'acteurs privés, dû notamment à la diversification des produits mis sur le marché. Cela a mené les chercheurs à développer de nouvelles formules de boissons basées sur les mélanges de fruits et de légumes qui seront satisfaisantes sur le plan organoleptique nutritionnel et économique (**Iberraken, 2016**).

La roselle est bien connue et appréciée pour son calice comestible qui peut être utilisé dans de nombreuses manières, y compris les boissons (**Islam, 2019**), dont «East Africa Roselle Company» (EARC) produit du jus et thé à base d'*Hibiscus* qui sont couramment produites pour les habitants de nombreux pays dont l'Egypte, le Soudan, le Nigeria, le Mexique, les Antilles, le Sénégal, le Bénin, la Côte d'Ivoire, Burkina Faso, Tanzanie et Kenya. (**Osei-Kwarteng et al., 2021**).

L'*Hibiscus sabdariffa* fait partie de la liste des plantes précieuses qui ont attiré l'attention immédiate face à plusieurs bienfaits pour la santé signalés aux consommateurs (**Tuan Azlan et al., 2020**) car elle contient de nombreux éléments nutritionnels et des propriétés thérapeutiques dans la plupart de ses parties. Elle est consommée dans la plupart des régions du monde comme boisson froide ou chaude, ses extraits sont également utilisés en médecine populaire pour traiter de nombreuses maladies, telles que l'hypertension artérielle, les maladies du foie et la fièvre (**Musa et al., 2021**).

Le jus de bissap s'est avéré avoir le potentiel d'un excellent transporteur dans le développement de boissons fonctionnelles avec de l'acide gibbérélique agissant comme source prébiotique. Les produits alimentaires de la Roselle sont classés comme aliments fonctionnels, apportant ainsi aux consommateurs des bénéfices sur la santé requis en misant

sur l'apport important de leurs composés phytochimiques (**Cid-Ortega et Guerrero-Beltràn, 2015**).

Notre travail de fin d'étude consiste à un essai de fabrication de nouvelles formules de boissons qui n'est pas connu ni commercialisé en Algérie, élaborée à partir des calices de la plante *H. sabdariffa* appelée couramment Karkadé, avec des différents arômes naturels (citron-menthe et fraise) au niveau de l'unité **IFRUIT** de sarl « **IFRI** ». Ce travail vise aussi le suivi de la qualité microbiologique et physico-chimique (pH, degré Brix et l'acidité titrable) et la stabilité du produit fini.

Notre travail est divisé en deux parties dont la première consiste à rapporter, décrire des généralités sur la plante *H. sabdariffa* et le jus de bissap (classification, origine, compositions, intérêts...). La deuxième partie expérimentale dont on cite le matériel et les méthodes utilisées pour réaliser des analyses physicochimique et microbiologique des matières premières et le produit fini. Enfin interprétation et discussion des résultats obtenus.

Partie
Bibliographique

I. Généralités sur la plante *Hibiscus sabdariffa*

I.1 Origine et historique

L'oseille de Guinée est originaire d'Inde ou d'Afrique notamment au Soudan d'abord où il aurait été domestiquée il y'a 6000 ans. Puis, elle atteint le nouveau monde au XVIIème siècle, emporté par les esclaves. Elle est le fruit d'un hibiscus buissonnant de 2 à 3 m de hauteur, aux tiges pourpres. Sa première apparition en Europe date de 1576 (**Bahaeldeen et al., 2012**). La culture a été signalée en Asie depuis le début du XXe siècle où la sélection pour la production des fibres a lieu (Inde, Sri Lanka, Thaïlande, Malaisie et Java). La roselle est présente dans toutes les régions tropicales. En Afrique tropicale, elle est connue en particulier dans les zones de savane d'Afrique Occidentale et Centrale (**Ahabar, 2012**).

I.2 Classification

Le genre *Hibiscus* comporte environ 300 espèces, répartis dans la région tropical et subtropical dans le monde dont l'espèce *sabdariffa* qui a deux variétés: *H. sabdariffa* var *sabdariffa* et *H. sabdariffa* var *altissima* (**Priyanka et Dhanavel, 2020**). Le tableau I présente la classification taxonomique de la plante *H. sabdariffa*.

Tableau I: Classification taxonomique d'*H. sabdariffa* (**Priyanka et Dhanavel, 2020**).

Règne	Plantae
Sous-Règne	Tracheobionta
Embranchement	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsita
Ordre	Malvales
Famille	Malvaceae
Genre	<i>Hibiscus</i>
Espèce	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.

I.3 Définition de la plante

L'oseille de Guinée (*H. sabdariffa*) est une plante utilisée pour fabriquer une boisson rouge acidulée (Jade, 2013). Elle est très répandue en Afrique. Sa zone pluviométrique de prédilection est celle variant de 300 à 1000 mm par an. Elle est connue sous différents nom tels que Bissap, Dabléni, Karkadé... C'est une plante annuelle cultivée à la dérobée ou en association avec des cultures de céréales telles que mil, sorgho, fonio. La tige qui se ramifie abondamment présente une couleur rose foncée chez la variété à calice rouge. La figure 01 présente la plante de karkadé.



Figure 01: Plante de karkadé (Goule et al., 2012).

I.3.1 Types de bissap

Il existe deux types de bissap selon la couleur (Figure 02) (Goule et al., 2012):

- ❖ Un type blanc (ou vert): cultivé pour les calices et les feuilles utilisées pour la préparation des sauces.
- ❖ Un type rouge: est le plus apprécié pour les infusions, jus, confitures, gelées,...



Figure 02: Types de bissap (Goule et al., 2012).

I.3.2 Appellations

H. sabdariffa est connu sous différentes appellations: oseille de Guinée, bissap au Sénégal, karkadé en Afrique du Nord, roselle, Sorrel ou Sour tea en anglais, ngai-ngai en Afrique centrale, groseille de Noël aux Antilles et flores de Jamaica en Amérique centrale (Cissé et al., 2009).

I.4 Description de la plante

H. sabdariffa est une plante herbacée qui peut atteindre un à deux mètres de hauteur (Figure 03). Elle est caractérisée par des jeunes tiges à croissance parfois en baïonnette. Les feuilles sont alternées, pseudo-opposées et stipulées. Les graines sont ovoïdes et de teinte brune. A maturité, le fruit s'ouvre pour laisser apparaître les graines. Les fruits sont roses à la périphérie, devenant jaunes à l'intérieur pour finir avec un cœur pourpre bordeaux. Ils sont ronds, contiennent quelques graines et sont entourés par le calice persistant (Endrias, 2006).



Figure 03: Différentes parties d'une plante adulte de roselle (Kone, 2014).

I.5 Ecologie

H. sabdariffa se développe bien sous les climats tropicaux humides (Endrias, 2006). Les graines d'*H. sabdariffa* ont besoin d'une température minimale de 10 °C pour germer mais la température optimale pour le développement de la plante se situe entre 20 et 35 °C, avec des précipitations mensuelles de 130 à 250 mm pendant les trois à quatre premiers mois de croissance (Bahaeldeen et al., 2012). Le pH optimum du sol, pour son bon développement, se situe entre 5 et 6 (Cissé et al., 2009). Les meilleurs sols pour l'oseille de Guinée sont les sols sablonneux ou de type terreux (Endrias, 2006). Il est essentiellement cultivé sur des terrains plats (Cissé et al., 2009). Une pluie ou de fortes humidités à la récolte et au séchage peuvent

dégrader la qualité des calices et réduire par conséquent le rendement (**Bahaeldeen et al., 2012**).

I.6 Composition de la plante au niveau des calices

Les calices de *H. sabdariffa* constituent la partie la plus importante de la plante du point de vue économique. Ils contiennent des protéines, des vitamines, des polyphénols, des pectines, du carotène, des fibres, des minéraux, des anthocyanes (**Cissé et al., 2008**) (Tableau I, Annexe 02). La présence de tous ces éléments explique l'utilisation de *Hibiscus* dans divers domaines (**Endrias, 2006**). Ces calices contiendraient également des mucilages et des pectines ainsi que tous les acides aminés essentiels tels que l'Aspartate, Leucine, Lysine, Proline et Glutamine. Le colorant extrait des calices séchés d'*H. sabdariffa* contient différents anthocyanes dont les quantités sont relativement élevées: 1,5 g d'anthocyanes pour 100 g de calices séchés. Les principaux anthocyanes sont: la delphinidine-3-sambubioside et la cyanidine-3-sambubioside (**Marciel et al., 2018**). La relation entre l'activité antioxydante et l'anthocyanine dans des pétales d'*H. sabdariffa* a été étudiée à Taiwan. Le résultat démontre que le taux d'anthocyanine est élevé dans les pétales d'*Hibiscus* lesquelles sont donc, potentiellement, de bonnes sources d'antioxydants (**Endrias, 2006**).

I.7 Intérêts nutritionnels

Les calices, du fait de leurs concentrations élevées en acides, en vitamine C et surtout en anthocyanes, constituent la partie de la plante la plus valorisée. Ils sont surtout utilisés pour la production de boissons désaltérantes et tonifiantes sans alcool. Ils sont aussi utilisés dans la préparation de confitures, de marmelades et d'infusions (**Cissé et al., 2008**). Les extraits de calices, sous forme de concentré ou de poudre séchée, sont utilisés comme colorant naturel dans les industries alimentaires (pâtisserie, jus de fruits, boissons,...) ou pharmaceutique (**Cissé et al., 2009**). Dans ces deux secteurs où l'on cherche des colorants naturels au profit des produits de synthèse, les atouts du bissap sont assez nombreux par rapport à la betterave qui donne un colorant rouge foncé, au raisin dont le taux de colorant est faible, à la cochenille, bon colorant mais très cher (**Gueye, 2005**).

I.8 Intérêts économiques

Les premiers marchés d'importation des calices d'*H. sabdariffa* sont les Etats Unis et l'Allemagne. L'Angleterre n'est pas un importateur régulier du produit car la tisane en provenance de l'Allemagne satisfait une grande partie de la demande. Les principaux clients d'importateurs sont les fabricants de tisanes car le calice et la capsule séchés entrent dans la

fabrication de la plupart des tisanes en même temps que l'écorce d'ananas, d'orange et jus de citron. La chine est le producteur dominant de fleurs séchées d'*H. sabdariffa* sur le marché. Elle est suivie du Soudan avec 20000 à 30000 tonnes avec une qualité très appréciée. La Thaïlande et le Mexique sont des producteurs moyens; la Thaïlande a fait de gros efforts en termes de qualité au cours des premières années. Le Sénégal, l'Égypte, la Tanzanie, le Mali et la Jamaïque sont de petits producteurs avec une production allant de 1500 à 3000 tonnes selon les pays (Thiam-Donde, 2013). Selon la FAO (2004), c'est l'une des plantes avec le plus grand volume de produits botaniques spécialisés. Les pièces utiles comprennent les feuilles, calices, tiges et graines. Cependant, le calice est la partie de la plante Roselle qui a une valeur économique élevée. (Gomaa et Rashed, 2016).

I.9 Principales utilisations

L'espèce *H. sabdariffa* est utilisée dans l'alimentation humaine et dans l'industrie agroalimentaire. La plante est exploitée pour ses calices, feuilles et graines (Cissé et al., 2008). Le tableau II présente les différentes utilisations alimentaires d'*H. sabdariffa*.

Tableau II: Différentes utilisations alimentaires d'*H. sabdariffa* (Cissé et al., 2008).

	Différentes utilisations			
	Alimentation	Médecine		Industrie
		Interne	Externe	
Calices	Fabrication de glaces, de gelée confitures, préparation des boissons (bissap) et ifusions, ingrédients dans la cuisine (sauces), vin et vinaigre.	Antiseptique urinaire, emploi diurétique, lutte contre bronchite, stomatique et / ou angine.	Traitement de furoncles, abcès, dermatoses, prurigineuses et hémorroïde.	Colorant
Feuilles	Sauces aigres, légumes feuilles.			
Graines	Transformation en condiments, (Soumbala), production de farine, production d'huile.			

II. Généralités sur le jus de bissap

II.1 Définition

Il s'agit d'une boisson acidulée de couleur rouge (**Jade, 2013**). C'est aussi une boisson très populaire en Égypte et au Soudan. On peut utiliser les fleurs en infusion en mettant simplement quelques-unes dans de l'eau très chaude. On y ajoute parfois des feuilles de menthe (**Adjoba, 2016**).

II.2 Fabrication de jus de bissap

Ces boissons sont toutes élaborées à partir d'un extrait aqueux obtenu après trempage des calices dans l'eau chaude ou à température ambiante. Après filtration, du sucre est ajouté, en chauffant selon les types de produits, pour la confection de la boisson finale. (**Thiam-Donde, 2013**). Les figures 04 et 05 présentent les deux procédés de fabrication de jus de bissap industriel et traditionnel.

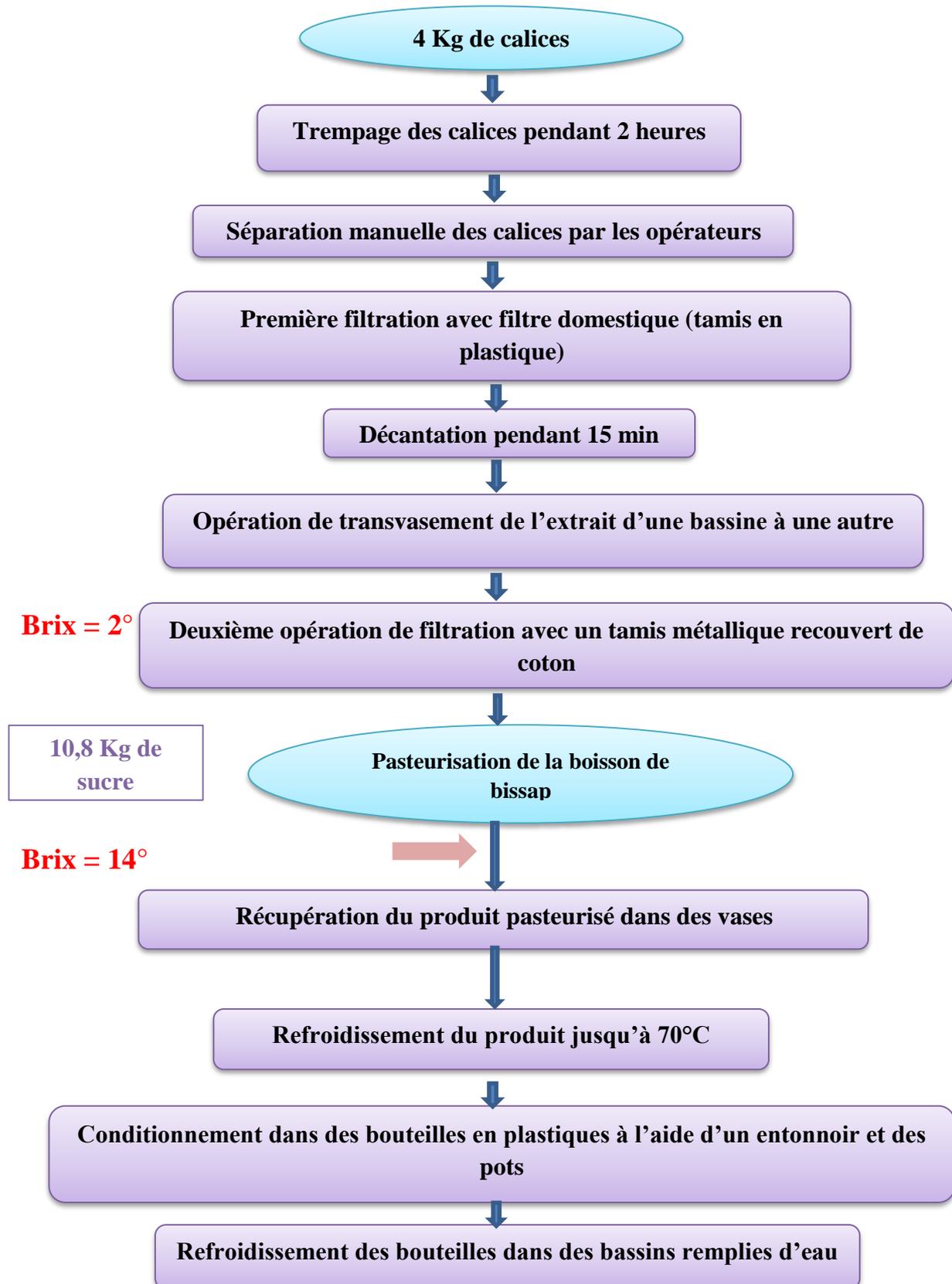


Figure 04: Diagramme de fabrication de boissons industrielles de bissap (Thiam-Donde, 2013).

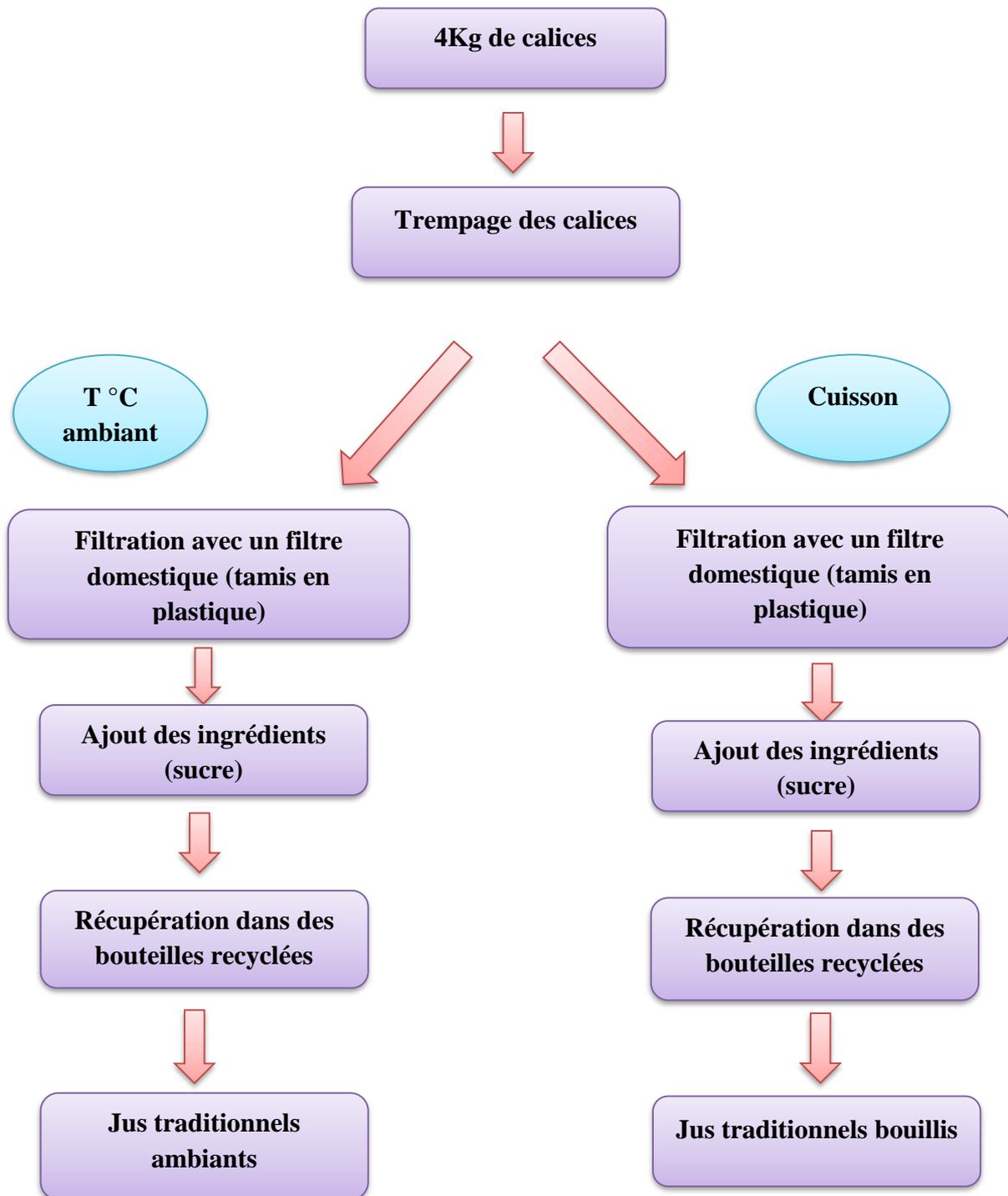


Figure 05: Diagramme de fabrication de boissons traditionnelles de bissap (Thiam-Donde, 2013).

II.3 Intérêts thérapeutiques de bissap

Le bissap est souvent utilisée dans la médecine traditionnelle étant riche en composés phytochimiques comme les polyphénols, en particulier les anthocyanes, les polysaccharides et les acides organiques, c'est ce qui justifie d'ailleurs sa forte consommation en Afrique et son utilisation dans la pharmacopée traditionnelle sous diverses formes, ayant ainsi un potentiel énorme dans les utilisations thérapeutiques modernes (**Mariod et al., 2021**).

❖ Activité anti-hypertensive

Des extraits de différentes parties de la Roselle ont montré leur efficacité pour abaisser la tension artérielle chez les humains hypertendus (**Inuwa et al., 2012**), et donc sert comme un agent hypotenseur et de première ligne de défense contre un niveau accru d'hypertension (**Walton et al., 2016**). Parmi les médicaments à base des calices d'*H. sabdariffa* on trouve HYPOTISANE® qui est utilisée comme diurétique dans la prise en charge de l'hypertension artérielle (**Sidibe, 2021**).

❖ Activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* de l'extrait de feuilles de Roselle a été évaluée contre les cellules macrophages murines en mesurant l'inhibition du protoxyde d'azote synthétisé (**Zhen et al., 2016**), et en utilisant un extrait méthanolique de ses fleurs montre une propriété de stabilisation de la membrane cellulaire (**Garbi et al., 2017**). Les anthocyanes obtenus à partir de calices principalement la delphinidine-3-sambubioside et la delphinidine, sont efficaces pour supprimer l'expression des médiateurs de l'oxyde nitrique qui sont synthétisés par les macrophages au cours d'une inflammation chronique (**Sogo et al., 2015**).

❖ Activité anti-obésité

Des études antérieures mettent en évidence l'utilisation de flavonoïdes et de phénols dans le traitement de l'obésité, par exemple, les anthocyanes de Roselle sont de puissants agents thérapeutiques contre l'obésité (**Ali et al., 2005 ; Sáyago-Ayerdi, 2007**). La consommation d'extrait de Roselle peut réduire le poids corporel, l'accumulation de lipides et le métabolisme du cholestérol total dont l'inhibition de la lipase pancréatique, ce qui réduira par conséquent l'absorption des lipides dans l'intestin (**Ojulari et al., 2019**).

❖ Activité antidiabétique

L'extrait de Roselle a de nombreuses applications dans la gestion de maladies telles que le diabète. En outre, ses applications thérapeutiques en tant qu'agent anti-inflammatoire, antihyperlipidémique et antihypertenseur sont également bien documentées. Cependant, les études d'efficacité de cette plante contre le diabète sont relativement peu nombreuses par

rapport à ses autres applications, c'est-à-dire anti-hypertensive ou anti-hyperlipidémie (**Bule et al., 2020**). Une étude récente a rapporté que cet extrait aidait à la régénération des cellules bêta pancréatiques (**Adeyemi et Adewole, 2019**). Notamment, les extraits aqueux riche en flavonoïdes de calices ont un effet antidiabétique contre le diabète de type 1 dont le traitement avec ceux-ci augmentait exceptionnellement la densité des cellules bêta (**Ndarubu et al., 2019**), et aussi efficace pour traiter le diabète de type II, pour abaisser le taux de cholestérol sérique et aider à la régulation de la glycémie (**Singh et al., 2017**).

❖ **Activité cardioprotectrice**

Les battements cardiaques arythmiques et d'autres facteurs de risque associés tels que l'athérosclérose peuvent être traités avec l'extrait de Roselle qui est bénéfique pour prévenir les dommages oxydatifs des tissus cardiaques (**Lim et al., 2016**). L'infusion aqueuse de calices contient des anthocyanes, des acides phénoliques et d'autres composés bioactifs responsables de la réduction de la tension artérielle et de la fonction cardioprotectrice (**Obouayeba et al., 2015**). L'hyperlipidémie dont l'amélioration du bilan lipidique (diminution des triglycérides, du cholestérol total et LDL, augmentation du HDL cholestérol) (**Hopkins et al., 2013**).

❖ **Traitement de l'anémie**

La Roselle est riche en acide ascorbique et le fer qui est l'une des espèces les plus citées contre l'anémie. L'absorption du fer non hémique chez les patients anémiques est accélérée par l'acide ascorbique, ce qui explique son rôle potentiel, comme antianémique en médecine traditionnelle (**Peter et al., 2014**). L'effet de l'extrait de ses fleurs a été étudié chez des femmes enceintes souffrant d'anémie prenant des suppléments de fer. Les résultats ont révélés que l'administration d'extrait accompagné de comprimés de fer augmentait significativement les taux d'hémoglobine, probablement en raison de l'acide ascorbique plus élevé présent dans Roselle (**Soejoenoes et al., 2017**).

❖ **Activité de prévention du cancer**

En ce qui concerne sa propriété antioxydante, les extraits de roselle sont recommandés tout en prenant une chimiothérapie pour les patients atteints de cancer, ainsi que pour lutter contre le cancer comme une maladie (**Da-Costa-Rocha et al., 2014**).

Ces anthocyanes comme la delphinidine-3-sambubioside favorisent l'apoptose contre la leucémie humaine et les cellules musculaires lisses. L'extrait de ses feuilles a été exploré contre le cancer de la prostate par l'inhibition de la croissance de xénogreffe de la tumeur (**Lin**

et *al.*, 2012). Le jus de Roselle a un effet antiprolifératif des cellules cancéreuses sur le col de l'utérus, de l'ovaire et du sein (Akim et *al.*, 2011).

❖ **Activité antimicrobienne**

Les extraits d'*H. sabdariffa*, y compris les feuilles, calices et graines, possèdent les propriétés et la capacité d'inhiber la croissance des isolats de bactéries à la fois gram-négatif et gram-positif à partir des échantillons alimentaires, vétérinaires et cliniques (Quansah, 2021). Les extraits aqueux-méthanolique de cette plante ont montrés une activité antibactérienne sur plusieurs germes dont *Staphylococcus aureus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marsecens*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Clostridium sporogenes* (Olaleye et Tolulope, 2007).

Les composés phénoliques (y compris les flavonoïdes et le cyanure) remplissent une fonction antimicrobienne, où le flavonoïde avec sa chaîne phénolique peut diminuer le niveau de fer, augmenter le niveau d'hydrogène et enfin neutraliser les enzymes bactériennes (Alshami et Alharbi, 2014), de plus ces flavonoïdes auraient également la capacité d'inhiber la formation de biofilms bactériens car le groupe phénolique de l'extrait peut se lier fortement aux protéines et aux enzymes microbiens, cette activité empêche les bactéries de produire un biofilm (Sulistyani et *al.*, 2016). Ce résultat est essentiel, compte tenu du fait que *Staphylococcus epidermidis* et certaines bactéries gram-positives et gram-négatives sont capables de produire des biofilms. Ainsi, l'extrait des calices peut être appliqués comme traitement alternatif pour les infections causées par *S. epidermidis* (Lusida et *al.*, 2017), il inhibe aussi *E. coli* 157:H7 isolé à partir des aliments de source vétérinaires, et cliniques avec une zone d'inhibition plus élevée pour les sources vétérinaire (Fullerton et *al.*, 2011).

❖ **Autres activités**

Certains scientifiques ont atteint l'extrême efficacité de la plante d'*Hibiscus* comme hydratant et tonique pour le corps, pour éviter la sensation de soif, elle est utile par temps chaud et pendant le jeûne parce qu'il contient une teneur élevée en vitamine C, elle peut aussi aider à traiter le rhume, toux et forte fièvre. Elle contient des désinfectants pour se débarrasser des ténias et des Ascaris dans l'intestin. Elle semble être utile pour éliminer les douleurs pendant le cycle menstruel (Jabeur et *al.*, 2017).

Partie Pratique

I. Matériel et méthodes

I. Objectif d'étude

Notre travail a pour le but de mettre au point la formulation et la fabrication d'une nouvelle boisson à base d'une plante très intéressante « *Hibiscus sabdariffa* » aromatisée naturellement, au niveau de l'unité « **IFRUIT** », et la réalisation d'un suivi de la qualité physicochimique et microbiologique de la matière première jusqu'au produit fini.

II. Présentation de l'unité de fabrication IFRI « IFRUIT »

L'usine Ifruit est implantée dans la zone industrielle Taharacht à Akbou wilaya de Béjaïa dont sa superficie totale est 20 ha et une surface couverte de 18.600 m². La SARL IBRAHIM et FILS « IFRI » est une société à caractère industriel évoluant dans le domaine agro-alimentaire. Elle se situe à Ighzer Amokrane, Daïra d'Ifri Ouzellaguene, dans la Wilaya de Bejaia. Elle est implantée à l'entrée de la vallée de la Soummam, au contre bas du massif montagneux du Djurdjura qui constitue son réservoir naturel d'eau.

A l'origine il y avait la limonadière Ibrahim, fondée en 1986 par monsieur Ibrahim Laid et ayant pour activité la production d'eau gazeuse (limonade) et sirop. Dix ans plus tard, en 1996, cette société à caractère familial, inaugure son premier atelier d'embouteillage d'eaux minérales en PET (Poly éthylène téréphtalate). A cette date plus de 7,5 millions de litres d'eaux minérales sont commercialisés à l'échelle nationale. En 2011, la production dépassera les 504 millions de litres dans toute la gamme des produits « Ifri ». En 2012 « Ifri » crée la première ligne aseptique en Afrique qui se fonde sur la technique de la pasteurisation dans le tank aseptique puis le remplissage à froid. Cette dernière permet une longue conservation, grâce à leur excellente qualité microbiologique pour préserver la qualité du fruit au profil du consommateur.

Les objectifs de cette entreprise sont : élargir sa gamme de produit (objectif qualitatif), et d'augmenter sa capacité de production (objectif quantitatif).

Après avoir couvert les besoins du marché national, Ifri se lance dans la conquête du marché international, en exportant désormais ses produits vers 14 pays: France, Royaume-Uni, Canada, Espagne, Italie, Allemagne, Belgique, Luxembourg, Soudan, Mali, Niger, Emiraties Arabes Unis, Lybie, Sénégal.

La gamme de produit fabriquée par l'unité « IFRUIT » des différents emballages (PET, verre et cannete) sont :

❖ **Jus au de concentré de fruit (0,33L, 1L, 1,25L et 2L) :**

Orange, raisin mure pomme, citron, pêche orange, pêche abricot, tropical, ananas et orange, orange gazéifié, citron gazéifié. Béréd Thé glacé citron, pêche.

❖ **Boisson lactée (0,33L ,1L) :**

Fraise-pomme, mangue-orange, banane et fruit de passion.

❖ **Boisson isotonique (0,5L) :**

Cerise (AZRO rouge), fraise-ananas (AZRO bleu), orange, citron.

❖ **Jus 100%Nature (1L et 2L) :**

Orange 100% et pomme 100%.

❖ **Soda (0,33L, 1L ,2L) :**

Citron jaune, citron vert, orange, ananas, agrumes, citron-menthe, pomme verte, fruits rouges, pomme caramel, banane, ananas-coco.

❖ **P'tits fruits (0.20L) :**

Orange, raisin-mure, pêche-orange, exotique, fraise-orange, pêche-orange au lait, raisin-mure au lait, orange-ananas au lait, banane-passion au lait.

❖ **Boisson énergisante (0,33L) :** Izem.

L'organigramme (figure 01, Annexe 01) présente les différentes directions et services de l'entreprise.

III. Ingrédients utilisés pour la fabrication de la boisson

Pour la fabrication de nos boissons, les ingrédients suivants sont utilisés:

- **Karkadia :** Achetée chez une épicerie à Akbou.
- **Citron:** Récolté dans un jardin au village Belayal (Annexe 2, Tableau V).
- **Menthe fraîche:** Retiré dans un jardin au village Belayal (Annexe 2, Tableau III).
- **Fraises:** Achetée au marché (Annexe 2, Tableau IV).
- **Sucre.**
- **Eau:** L'eau osmosée (l'eau de process) de l'unité «**IFRUIT**».
- **La pectine** (Agents texturant), **l'acide citrique** et **l'acide ascorbique** (conservateurs) ont été utilisés comme additifs.

IV. Fabrication de boisson bissap

Pour préparer nos boissons aromatisées naturellement (citron-menthe, fraise), les ingrédients cités ci-dessus sont utilisés, en suivant ces étapes:

- ❖ 250ml de l'eau est chauffé jusqu'à l'ébullition, additionné de 2,5g de calices et quelques feuilles de menthe fraîches après leurs rinçages (cas de l'arôme citron-menthe), et laisser à l'ébullition pendant 10 à 15 min.
- ❖ Après filtration du mélange, la boisson obtenue est additionnée de 35g de sucre, 0,2g de l'acide citrique, 0,2g de l'acide ascorbique, 2g de la pectine (cas de l'arôme citron-menthe) et de l'arôme selon le choix; 100ml de jus de fraise ou 6ml de jus de citron naturels.
- ❖ Une fois la boisson est prête, il est conditionné dans des flacons stériles de 250 ml.
- ❖ Une pasteurisation est réalisée dans un bain marie à 95°C pendant 15min, suivie d'un refroidissement rapide avec de l'eau (25°C).
- ❖ Entreposage, stockage à 4°C. Les flacons des boissons sont entreposés au frais.

V. Méthodes et techniques d'analyse

Avant la préparation de la boisson, l'eau de process (osmosée) utilisée pour la fabrication est analysée. Une fois la boisson est prête, des analyses physicochimiques, microbiologiques et organoleptiques suivi d'un test de stabilité sur le plan microbiologique pour une durée de 21 jours sont effectués. Toutes ces analyses sont réalisées en appliquant les protocoles adoptés par l'entreprise.

V.1 Analyses physicochimiques

V.1.1 Analyses de l'eau de process

a. Mesure de potentiel d'hydrogène (pH)

Le pH de l'eau est mesuré à l'aide d'un pH mètre préalablement étalonner et sa valeur est affichée directement sur l'écran de l'appareil.

b. Mesure de la conductivité (cond)

La mesure de la conductivité consiste à plonger l'électrode dans l'échantillon. Une valeur stable s'affichera directement sur l'écran du conductimètre.

c. Détermination du titre hydrotimétrique (TH)

Pour procéder à la mesure, 50 ml de l'échantillon de l'eau à analyser sont mis dans un erlenmeyer, puis additionné de 4 ml de tampon ammoniacal (pH=10), et quatre gouttes de l'indicateur coloré Noir Eriochrome T (NET) 0,5%. La coloration bleue indique un TH = 0°F, une coloration rouge brique, un titrage est réalisé avec l'EDTA (0,02 N) jusqu'à l'obtention d'une coloration bleue. **TH °F= V de chute de burette × 2**

d. Détermination des chlorures (Cl⁻)

100ml d'échantillon d'eau à analyser sont additionnés de 2ml de l'indicateur coloré Chromates de Potassium K₂CrO₄. Une coloration brune indique que [Cl⁻]= 0 mg/l, une coloration jaune, implique un titrage avec le Nitrates d'argent (AgNO₃) 0,05 N jusqu'au virage de la couleur jaune à la brune. **[Cl⁻] (mg/l) = V de chute de burette × 17,75**

e. Détermination de Titre Alcalimétrique (TA)

Dans un erlenmeyer, 100ml de l'échantillon d'eau à analyser sont mis, puis additionné de quatre gouttes de l'indicateur coloré phénophtaléine C₂₀H₁₄O₄ (01%). L'absence de la coloration indique que TA=0°F. Une coloration rose indique qu'il faut faire un titrage avec l'acide sulfurique H₂SO₄ (0,1N) jusqu'à la décoloration.

$$\text{TA (°F)} = \text{V de chute de burette} \times 5$$

f. Détermination de Titre Alcalimétrique Complet (TAC)

On peut titrer le TA et le TAC avec le même échantillon. Après la détermination du TA, on note le volume versé V₁ (chute de burette 1) puis on ajoute pour le même échantillon d'eau 4 ml de méthyle orange (0,05%) et on titre jusqu'au virage de l'orange rouge et on note la chute de burette 2 (V₂). **TAC (°F) = (V₁ + V₂) × 5**

V.1.2 Analyses de boissons bissap

a. Mesure du pH

La mesure du pH est réalisée de la même manière que le mode opératoire appliqué dans l'analyse de l'eau.

b. Détermination du degré Brix (extrait sec soluble)

Après avoir allumé le réfractomètre, l'étalonnage se fait par nettoyage du prisme avec de l'eau distillée, séchage avec du papier absorbant. Ensuite, quelques gouttes de boisson sont versées et le résultat est affiché sur l'écran.

c. Détermination de l'acidité

Dans un bécher, 10ml de boisson sont mis, puis additionnés de l'eau distillé et quatre gouttes de phénolphtaléine (1%). La titration est effectuée avec de l'hydroxyde de sodium NAOH (1N), jusqu'au virage (apparition de la couleur rose pâle). L'acidité est calculée par l'équation suivante :

$$A \text{ (g/l)} = V \text{ de chute de burette} \times 0,64.$$

V.2 Analyses microbiologiques

D'après le J.O.R.A (2017) et la réglementation de l'entreprise les microorganismes recherchés dans les matières premières et la boisson bissap sont résumés dans le tableau III.

Tableau III: Les germes recherchés dans les matières premières et la boisson bissap (JORA 2017).

	Eau	Bissap	Jus de fraise	Jus de citron
Coliformes totaux	X	X	X	X
Coliformes fécaux (<i>Escherichia coli</i>)	X			
Streptocoques fécaux (Entérocoques)	X			
Clostridium sulfito-réducteur	X			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	X			
FTAM		X	X	X
Levures et moisissures		X	X	X
Levures osmophiles		X	X	X

V.2.1 Analyses de l'eau de process

a. Prélèvement et préparation des échantillons d'eau

L'échantillonnage d'eau est effectué dans des conditions d'asepsie à partir des différentes cuves d'eau osmosée et filtrée (ultrafiltrée) qui sont dotés d'un système spécial pour le prélèvement. D'abord, le robinet est ouvert pour libérer la pression, puis, l'eau est laissée s'écouler quelques secondes avant de prélever afin d'éviter toute éventuelle contamination. Ensuite, l'endroit autour du robinet est stérilisé avec de l'éthanol puis un flambé, et le débit est réglé. Les flacons en verre stériles sont remplis à $\frac{3}{4}$. Enfin, le bouchon est remis tout de suite. Après le prélèvement de l'échantillon d'eau, on le laisse sur la paillasse pour qu'il prenne la température ambiante du laboratoire (25°C).

Après le prélèvement des échantillons, l'eau est filtrée à travers une membrane de filtration (0,45µm) qui retient les microorganismes, en suivant ces étapes :

Premièrement, plan de travail est désinfecté, ensuite, l'entonnoir en acier inoxydable, le fritté, le couvercle et les pincettes ont été stérilisés à la flamme (bec Bensen). A l'aide d'une pincette, la membrane de filtration est enlevée de son emballage et déposée sur le fritté. Puis, la pompe est démarrée pour aspirer l'eau versée qui est de 50ml pour rechercher les spores anaérobies sulfito-réducteurs et 250ml pour la recherche et le dénombrement des autres microflore. Enfin, ces membranes sont déposées sur les milieux de cultures gélosés en évitant la formation des bulles d'air, et incubées à différentes températures selon les germes recherchés. Le tableau IV résume les analyses microbiologiques de l'eau. Le dénombrement est effectué en double (deux boîtes) pour chaque germe recherché.

Tableau IV: Analyses microbiologiques de l'eau.

Germes	Recherche et/ou dénombrement	Milieu de culture utilisé	Durée et Température d'incubation	Lecture	Référence de la technique
<i>E. coli</i>	Recherche et dénombrement	Gélose Tergitol+ TTC	44±0,5°C/21±3h	Colonies rouges sous les UV	NF EN ISO 9308-1 (2000)
Coliformes totaux			36±2°C/21±3h	/	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Détection et dénombrement	Gélose Cétrimide	36±2°C/44±4h	Colonies bleu-vert ou fluorescente sous les UV ou brunes rougeâtres	J.O.R.A (2013)
Entérocoques intestinaux (Streptocoques du groupe D)	Recherche et dénombrement	Gélose Slanetz et Bartley	36±2°C/44±4h	Colonies brunes à noires	NF EN ISO 7899-2 (2000)
Clostridium sulfito-réducteur (CSR)	Recherche et dénombrement	Gélose Viande-foie	36±2°C/44±4h	Colonies noires	NF T 906415 (1985)

b. Confirmation des résultats

• Coliformes NF EN ISO 9308-1 (2000)

Après incubation, toutes les colonies typiques apparues quelques soit leurs tailles sont considérées comme des bactéries lactose-positives si le milieu sous la membrane présente une coloration jaune. Pour confirmer l'identité des coliformes totaux et fécaux (*E. coli*), les tests suivant sont utilisés:

- ❖ **Test oxydase:** Les bactéries lactose-positives obtenues sont ensemencées sur la gélose tryptonée au soja (TSA) non sélective et incubé pendant 21±2h à 36±2°C.

Après incubation, à l'aide d'une anse en platine, une partie de la culture est étalée sur le papier filtre utilisé pour la recherche de l'oxydase. La réaction est considérée comme positive lorsqu'une coloration bleu-violet foncé apparaît dans les 30s.

Toutes les colonies ayant une réaction négative à l'oxydase sont considérées comme étant des bactéries coliformes.

- ❖ **Test d'indole:** A partir de colonies oxydase-négatives, des tubes contenant le bouillon tryptophane sont ensemencés et incubés pendant 21 ± 3 h à $44\pm 0,5$ °C. La production d'indole est contrôlée en ajoutant 0,2 à 0,3ml de réactif de Kovacs. L'apparition d'une coloration rouge à la surface du bouillon confirme la production d'indole.

Toutes les colonies ayant une réaction négative à l'oxydase mais positive à l'indole sont considérées comme des *E. coli*.

- ***Pseudomonas aeruginosa* J.O.R.A (2013)**

Après incubation, toutes les colonies produisant une pigmentation bleu-vert (pyocyanine) comme *Pseudomonas aeruginosa* confirmés, et les colonies fluorescentes sous les UV et celles produisant une pigmentation brune-rougeâtre comme *Pseudomonas aeruginosa* présumés sont comptées. La confirmation de leurs identités est confirmée en utilisant les tests suivants :

Tests de confirmation

Toutes les colonies nécessitant une confirmation ont été repiquées sur une gélose nutritive à partir de la membrane et incubées pendant 22 ± 2 h à 36 ± 2 °C. Après avoir vérifié la pureté des isolats, les colonies brunes rougeâtres sont soumises aux tests suivants:

- ❖ **Test oxydase:** A l'aide d'une anse en platine, une partie de la culture est étalée sur le papier filtre utilisé pour la recherche de l'oxydase. La réaction est considérée comme positive lorsqu'une coloration bleu-pourpre foncée apparaît dans les 10s.
- ❖ **Milieu de King B :** Les colonies brunes rougeâtres oxydase positive obtenues sont repiquées sur un milieu de King B, et incubées à 36 ± 2 °C pendant cinq jours. La culture est examinée sous un rayonnement UV pour noter la présence d'une éventuelle fluorescence.
- ❖ **Bouillon d'acétamide:** Un tube de bouillon d'acétamide est ensemencé à l'aide du repiquage obtenu sur la gélose nutritive et incubé pendant 22 ± 2 h à 36 ± 2 °C. Après incubation, une ou deux gouttes de réactif Nessler sont ajoutées, et les tubes sont examinés afin de déceler une production d'ammoniac qui se traduisait par une coloration allant du jaune au rouge brique.

Toutes les colonies produisant de la pyocyanine (pigmentation bleu-vert) ou oxydase positive, donnant un lieu à une fluorescence sous les UV et aussi celles fluorescentes sur le

milieu King B, capables de produire de l'ammoniac à partir de l'acétamide sont confirmées en étant des *P. aeruginosa*.

• **Entérocoques intestinaux (Streptocoques du groupe D) NF EN ISO 7899-2 (2000)**

Après incubation, toutes les colonies bombées montrant une couleur rouge, marron ou rose soit au centre soit sur l'ensemble de la colonie sont considérées comme colonies typiques et elles nécessitent une confirmation par le transfert de la membrane à l'aide d'une pince stérile sans retournement sur une boîte de gélose BEA (Bile-Esculine-Azoture) qui est préchauffé à 44°C puis incubé pendant 2h à 44±0,5°C. Toutes les colonies typiques montrant une couleur brune à noire dans le milieu sont comptées comme des entérocoques intestinaux.

V.2.2 Analyses de boissons bissap

Avant l'analyse microbiologique de bissap produit, des analyses des matières premières utilisées sont effectuées (jus de citron et de fraises).

❖ Préparation des dilutions

A partir de la boisson bissap et les matières premières (jus de citron et fraises) des dilutions décimales (10^{-1} et 10^{-2}) sont préparées dans 9 ml d'eau peptonée.

a-Dénombrement des levures et moisissures ISO 21527-1 (2008)

A partir des dilutions décimales 0,1ml de chaque dilution est ensemencé en surface dans deux boîtes de Pétri contenant le milieu DRBC (Dichloran Rose Bengale Chloramphénicol). Ces dernières sont incubées à 25±1°C/ 5 jours. L'apparition des colonies filamenteuses implique la présence des moisissures et des colonies roses pour les levures.

b-Recherche et dénombrement des levures osmophiles ISO 21527-1 (2008)

A partir des dilutions décimales, 1ml de chaque dilution est ensemencé en masse dans la gélose Honey. Les boîtes sont incubées à 25°C/72h. Toutes les colonies lisses blanches et sous forme lenticulaires sont considérer comme étant des levures osmophiles.

c-Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FTAM) ISO 4833-1 (2013)

A partir des dilutions décimales, 1ml de chaque dilution est ensemencé en masse dans le milieu PCA. Après incubation à 30°C/72 ± 3h, les boîtes contenant moins de 300 colonies sont comptées.

d-Dénombrement des coliformes ISO 4832 (2006)

A partie des dilutions décimales, 1ml de chaque dilution estensemencé en masse dans milieu VRBL. Les boites sont incubées à 37°C/24±2h. Toutes les colonies violacées de diamètre égal ou supérieur à 0,5 mm et parfois entourées d'une zone rougeâtre sont considérées comme étant des bactéries coliformes.

❖ Expression des résultats

Tous les dénombrements sont réalisés dans deux boites de Petri pour chaque dilution. Le calcul du nombre de microorganismes (flore mésophile aérobie totale, coliformes, levures et moisissures et levures osmophiles) par millilitre d'échantillon à partir du nombre de colonies obtenues dans les boîtes de Petri choisies est réalisé par l'équation suivante:

$$N = \Sigma C / (n_1 + 0,1 n_2) \times d$$

Dont :

N : Le nombre estimé de germes par ml du produit.

ΣC : La somme des colonies dans toutes les boites retenues.

d : La dilution à partir de laquelle les premiers dénombrements sont obtenus.

n₁ : Le nombre de boites retenues à la première dilution.

n₂ : Le nombre de boites retenues à la seconde dilution.

V.3 Test de stabilité

Le test de stabilité sert à définir le comportement physico-chimique et microbiologique et à confirmer la stabilité de la boisson bissap produite dans des conditions climatiques différentes dont le facteur le plus important est la température. Pour garantir au consommateur une meilleure qualité hygiénique, selon la législation en vigueur, tout nouveau produit sur le marché doit être soumis, au préalable à un test de stabilité dont les différentes épreuves sont détaillées dans le J.O.R.A (1998). Plusieurs échantillons ont été préparés pour réaliser une série d'analyse pendant 21 jours (J₀, J₃, J₇, J₁₅, J₂₁) à différentes conditions de stockage (Tableau V):

- ❖ Les analyses physicochimiques (pH, l'acidité titrable et le degré Brix) sont effectuées avec les mêmes protocoles déjà expliqués dans les analyses physicochimiques de la boisson bissap.
- ❖ Les analyses microbiologiques (recherche et dénombrement des levures et moisissures, FTAM, levures osmophiles et coliformes) sont effectués avec les mêmes protocoles déjà expliqués dans les analyses microbiologiques de la boisson bissap.
- ❖ Les analyses organoleptiques effectués par un groupe de six personnes en donnant leur appréciation sur la couleur, l'odeur, le goût et la texture des différents échantillons dans chaque période (J₀, J₃, J₇, J₁₅, J₂₁) de stockages et cela pour estimer les conditions favorables de conservation de la boisson bissap.

Tableau V: Différents conditions de stockage de la boisson bissap.

Echantillons	J ₀	J ₃	J ₇	J ₁₅	J ₂₁
Conditions de stockage	Température ambiante (22°C) + lumière (témoin)				
	Température ambiante (22°C) + obscurité (témoin)				
	30°C (étuvé)				
	Soleil				

Partie Pratique
II. Résultats et discussion

I. Résultats des analyses physico-chimiques

I.1 Résultats d'analyses de l'eau

Dans les boissons aux fruits, l'eau constitue environ 87 à 92% du volume de la boisson. L'eau utilisée est généralement prétraitée séparément afin qu'elle soit débarrassée des impuretés, des microorganismes, et d'autres éléments indésirables tels que les odeurs, les arrière-goûts et la turbidité. Elle est aussi traitée afin de réguler son alcalinité et sa dureté. (APAB, 2011). Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau VI.

Tableau VI: Résultats d'analyses physico-chimiques de l'eau osmosée.

Paramètres	Résultats	Normes de l'entreprise	Normes (JORA, 2011)
pH à 20°C	7,14	/	6,5-9
Conductivité à (µs/cm)	198	100-250 à 25°C	≤2800 à 20°C
Dureté totale TH	00	00-13 (°F)	≤200 (mg/l en CaCO ₃)
TA (°F)	00	/	00
TAC (°F)	00	/	00
Chlorures Cl ⁻ (mg/l)	67,4	≤100	≤500

L'ensemble des résultats obtenus dans le tableau ci-dessus sont conformes aux normes décrites par le JORA (2011), et aux exigences de l'entreprise. Cela nous renseigne sur le bon fonctionnement de la station de traitement des eaux au sein de l'entreprise IFRUIT. En plus de ces paramètres, l'eau de process adéquate à la fabrication du jus doit être incolore, claire et exempte de substances dissoutes.

I.2 Résultats d'analyses de bissap fini

Les résultats des différents paramètres physicochimiques issus de notre étude ont été exprimés dans le tableau II (Annexe 2).

I.2.1 Potentiel d'hydrogène (pH)

La figure 06 illustre les valeurs de pH des boissons formulées.

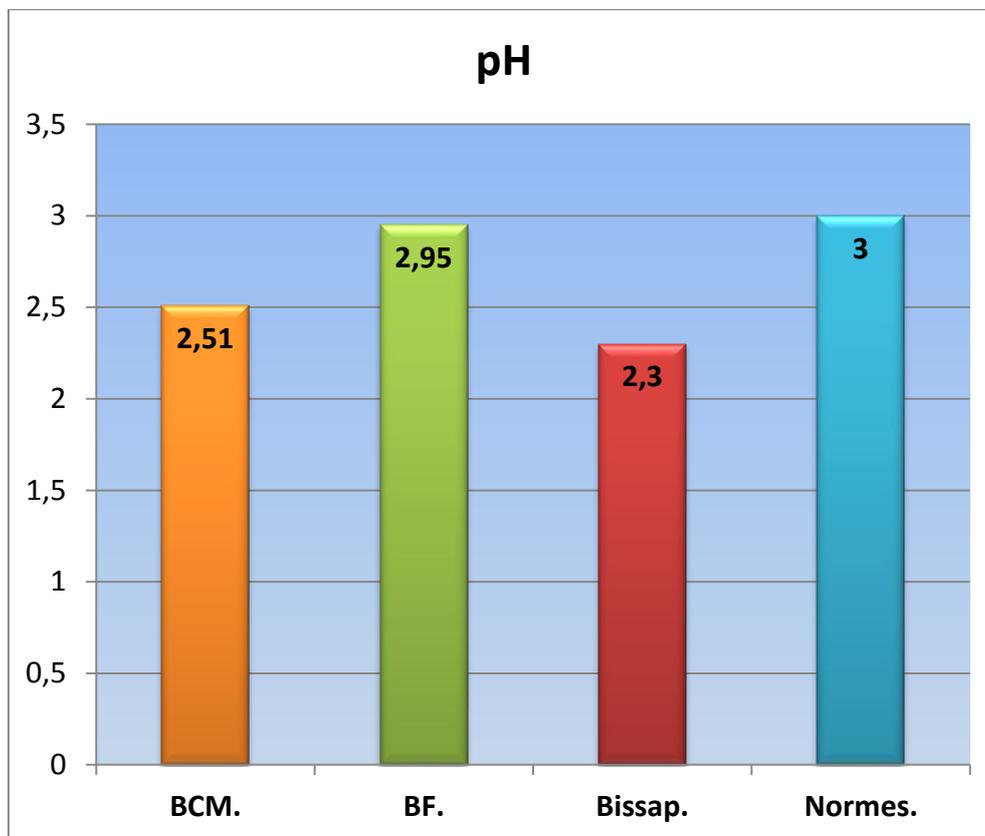


Figure 06: Résultats de pH des boissons formulées.

BCM: Bissap citron-menthe, BF: Bissap fraise.

D'après l'histogramme, on observe que le pH de **BCM** est plus acide (pH=2,51) que celui de **BF** (pH=2,95) or tous les deux sont inférieurs à la limite fixée par l'entreprise (pH_{max}=3), et sont supérieurs à celui de **bissap** (témoin) dont le pH=2,3. Les valeurs enregistrées se rapprochent quelque peu de celles rapportées par d'autres études où la valeur de pH mesurée pour les boissons formulées est supérieure à celle de **Bayoï et al. (2014)** dont le pH=1,59.

Cette variation peut être expliquée par la composition en acides organiques qui expriment le pH des ingrédients (jus de citron, fraises broyées, menthe et autres additifs) utilisés qui auraient un effet acidifiant, ce qui justifierait les légères baisses et augmentations de pH observée. Le pH_{citron}= 2,2-2,4 et pH_{menthe}=6,1-6,3 (**FOOD-INFO, 1999**), ce qui augmente légèrement le pH_{BCM} par rapport au pH_{Bissap}, et le pH_{fraise}= 03-3,5 (**FOOD-INFO, 1999**) ce qui fait le pH_{BF} est supérieur à celui de **BCM** et **Bissap**.

I.2.2. L'acidité titrable

L'acidité titrable correspond à la somme des acides minéraux et organiques libres dans le jus de fruits. Il s'agit de l'acide citrique dans le cas des jus d'agrumes.

La figure 07 illustre le taux d'acidité des boissons formulées.

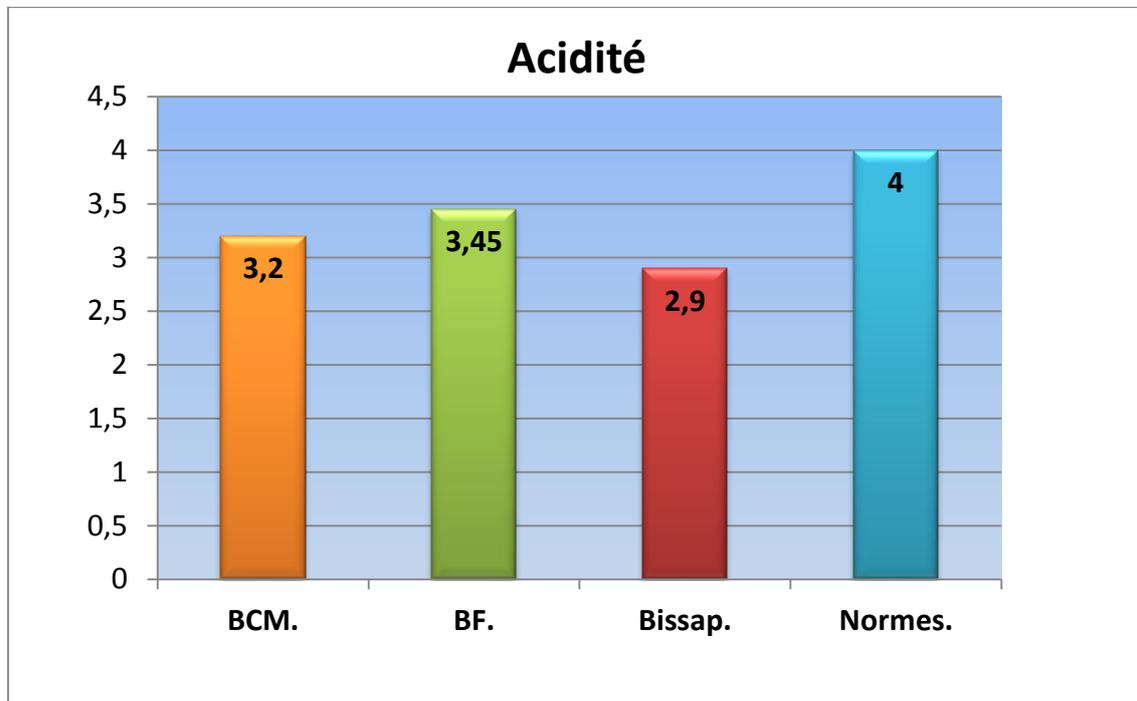


Figure 07: Résultats de l'acidité titrable des boissons formulées.

D'après l'histogramme, on remarque que l'acidité de **BCM** ($A=3,2\text{g/l}$) et **BF** ($A=3,45\text{g/l}$) sont supérieurs à celle de **Bissap** ($A=2,9\text{g/l}$). Cette forte acidité peut être justifiée par la diffusion des constituants acides des calices au cours de l'extraction. Selon **Cissé (2010)**, le pH des extraits d'*H. sabdariffa* varie entre 2,1 et 2,4. L'acidité des deux boissons (BCM et BF) est conforme et inférieurs à la limite fixée par l'entreprise ($A_{\text{max}}= 4\text{g/l}$). Les valeurs enregistrées se rapprochent de celles rapportées par d'autres études où la valeur de l'acidité mesurée pour les boissons formulées est supérieure à celle enregistrée par **Bayoï et al. (2014)** dont $A= 1,82\text{g/l}$.

La variation de l'acidité de boissons formulées est due à la composition de la plante en acides organiques dont majoritairement en acide malique ($1,36\text{g}/100\text{g}$) et en acide ascorbique ($72\text{mg}/100\text{g}$) (**Cissé et al., 2008**), et aussi la richesse en acides organiques des arômes utilisés dont la teneur moyenne de citron est de $4,55\text{ g}/100\text{g}$, celle de la menthe est négligeable (traces) et la fraise est de $0,85\text{g}/100\text{g}$ (**Ciquial-Anses, 2020**).

I.2.3. Extrait sec soluble (Degré Brix)

La figure 08 illustre le taux de degré Brix des boissons formulées.

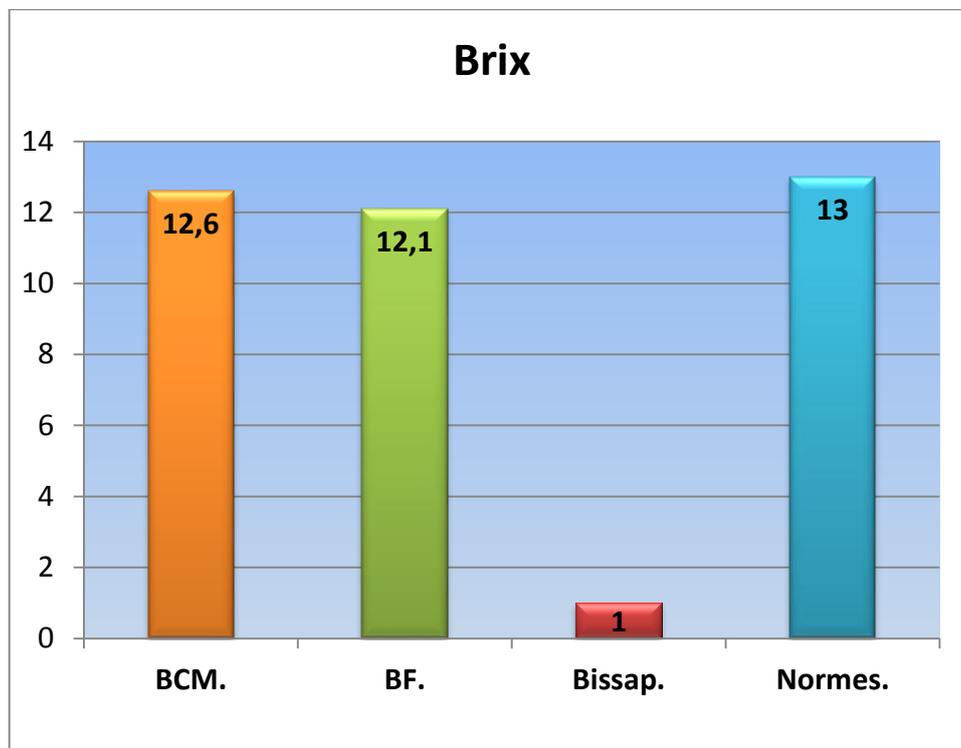


Figure 08: Résultats de degré Brix des boissons formulées.

D'après les résultats enregistrés, on remarque que l'extrait sec soluble de BCM (12,6 °B) est supérieur à celui de BF (12,1°B), mais tous les deux sont inférieurs à la limite fixée par l'entreprise (13°B), et sont supérieurs à celui de **bissap** (témoin) soit (1°B). Cette grande différence entre les deux boissons et le bissap, est due à la pauvreté de bissap en sucre. Les valeurs enregistrées se rapprochent de celles rapportées par d'autres études où la valeur de l'extrait sec soluble mesuré pour les boissons formulées est inférieure à celle de **Ndiaye et al. (2015)** dont la valeur est de 14°B.

Ces variations en extrait sec soluble présent dans les boissons formulées peuvent être dues à la composition en sucre des arômes utilisés pour leurs fabrications. Selon **Ciquel-Anses (2020)**, la teneur moyenne en sucre pour le citron est de 2,1g/100g, la menthe 5,3g/100g, et la fraise 5,6g/100g. Selon **Gurak et al. (2010)**, les acides assurent l'abaissement de la valeur de pH, assurant l'équilibre entre le goût, acide et sucré.

II. Résultats des analyses microbiologiques

II.1 Résultats d'analyses de l'eau

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VII.

Tableau VII: Résultats d'analyses microbiologiques de l'eau osmosée (process).

Germes	Résultats	Normes (JORA, 2017)
Coliformes totaux	Abs	Absence dans 250ml
<i>Escherichia coli</i>	Abs	Absence dans 250ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Abs	Absence dans 250ml
Germes aérobies à 30°C	Abs	<20 (selon l'entreprise)
Entérocoques	Abs	Absence dans 250ml
Spores anaérobies sulfito-réducteur	Abs	Absence dans 50ml

D'après les résultats obtenus pour les différents germes recherché et dénombrés, l'analyse microbiologique des échantillons d'eau analysés ne présentent aucun danger en raison de l'absence des germes pathogènes et des germes de contamination fécale. Ces résultats sont conformes aux normes décrites par le **JORA (2017)**. Ces résultats répondent aussi parfaitement aux exigences et la réglementation de l'entreprise, donc cela indique que l'eau est conforme pour la fabrication de la boisson Bissap.

II.2 Résultats d'analyse de la boisson Bissap

Les jus des fruits et légumes sont considérés parmi les produits les plus exposés aux contaminations et aux altérations microbiennes (**Ramos et al., 2013**). Les résultats obtenus pour les deux types de boissons formulés et les matières premières utilisées sont résumés dans le tableau VIII.

Tableau VIII: Résultats d'analyses microbiologiques des boissons formulées.

Germes	Bissap Citron-Menthe		Bissap Fraise		Jus de fraises	Jus de citron	Normes
	Abs	Abs	Abs	Abs			
Levures et moisissures	Abs	Abs	Abs	Abs	181UFC/ml de levures et 90UFC/ml de moisissures	9 UFC/ml de levures et Abs de moisissures	<10 ² (JORA, 2017)
Levures osmophiles	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	<20/1L (selon l'entreprise)
Germes aérobies à 30°C	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	<10 (selon l'entreprise)
Coliformes	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs (selon l'entreprise)

L'analyse microbiologique des matières premières montre l'absence des coliformes, des levures osmophiles et la flore aérobie mésophile à 30°C, et la présence de certaines levures et moisissures. L'analyse des deux boissons de bissap formulées dans cette étude a montré une absence des germes recherchés et dénombrés. Cela répond aux normes décrites par **JORA (2017)** et aussi répondent parfaitement aux exigences et la réglementation de l'entreprise.

La présence des levures et moisissures dans les matières premières dues au pH de celles-ci dont le pH du citron est 2,2-2,4 et celui des fraises qui est 03-3,5 (**FOOD-INFO, 1999**), qui sont incluses dans l'intervalle de pH pour la croissance et prolifération des levures et moisissures dont ces intervalles [1,5-11] et [2-8,5] respectivement. L'absence d'autres germes peut être expliquée par les pH acides de ces matières premières, qui inhibent la croissance de la plupart des germes non acidophiles.

L'absence des germes dans les boissons est le résultat de plusieurs facteurs, qui sont en premier lieu le respect des conditions d'hygiène durant la fabrication et aussi l'hygiène du matériel utilisé. En plus de ça, l'acidité et le pH qui ont un rôle très important pour l'inhibition de la croissance de certains microorganismes qui sont incapables de se développer dans les milieux acides, la forte pression osmotique due à la présence du sucre, l'efficacité de traitement thermique effectué pour les produits finis (pasteurisation).

III. Résultats de la stabilité de deux boissons au cours de stockage

Le test de stabilité sert à définir le comportement physico-chimique et microbiologique et à confirmer la stabilité de la boisson dans des conditions climatiques différentes dont le facteur le plus important est la température.

III.1 Résultats physicochimiques

Au cours du stockage dans des différentes conditions durant 21 jours, des analyses physicochimiques ont été déterminées pour évaluer la qualité et la stabilité du produit fini en mesurant le pH. Il a été remarqué une stabilité relative du pH dans l'intervalle [2,93-2,98] pour la boisson BF et [2,49-2,55] pour BCM. Les résultats de l'acidité des boissons conservés montrent des variations négligeables qui restent dans l'intervalle [3,42-3,48] pour la boisson BF et [3-3,6] pour BCM.

Pour le suivi de la stabilité du degré Brix des boissons stockées, ces valeurs restent dans les intervalles [11,8-12,4] et [12,3-12,9] respectivement pour BF et BCM. Le stockage des boissons bissap à différentes conditions et température citées déjà dans le test de stabilité ne présente aucun changement ni de pH ni d'acidité et ni de degré Brix, ce qui confirme que les boissons sont toujours conformes sur le plan physicochimique.

III.2. Résultats d'analyses microbiologiques

Les germes présents dans les jus de fruits et les autres boissons hygiéniques non alcoolisées proviennent en grande partie de la matière première. Le nombre de microorganismes dans les jus fraîchement pressés est souvent très élevé. Il dépend de l'état des fruits (maturation, propreté) et du type d'extraction. On trouve des levures, des spores de moisissures et des bactéries. D'autres contaminations sont apportées par le sucre et les sirops sucrés (levures osmophiles, moisissures et *Leuconostoc*), par le matériel utilisé pour la fabrication (levures et moisissures) et par les manipulations (germes de contaminations fécales) (**Guiraud, 2003**). Le tableau IX résume les résultats de la stabilité de deux boissons finis au cours du stockage.

Tableau IX: Résultats du test de stabilité durant 21 jours de stockage de deux types de boissons bissap formulées.

	Bissap Citron-Menthe						Bissap Fraise						Normes	
	J ₁	J ₃	J ₅	J ₇	J ₁₅	J ₂₁	J ₁	J ₃	J ₅	J ₇	J ₁₅	J ₂₁		
Levures et moisissures	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	<10 ² (JORA 2017)
Levures osmophiles	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	<20/1L (Selon l'entreprise)
Germes aérobies à 30°C	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	<10 (selon l'entreprise)
Coliformes	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Absence (selon l'entreprise)

Une absence de tous les germes recherchés a été observée, dans chaque période de stockage (J₁, J₃, J₇, J₁₅, J₂₁) durant 21 jours pour les deux boissons formulées. Ces résultats peuvent s'expliquer par la concentration élevée en sucre, qui joue un rôle important comme conservateur pour préserver les aliments par l'abaissement de l'activité de l'eau (A_w), et aussi les bonnes conditions de conservation par l'ajout des conservateurs chimiques (acide citrique et acide ascorbique).

On note que les germes pathogènes et d'altération sont extrêmement sensibles au traitement thermique de pasteurisation (95°C/15min). De plus, l'addition de sucre et de conservateurs à la boisson accroît sa stabilité microbiologique ce qui rend notre boisson conforme sur le plan microbiologique.

III.3. Qualité organoleptique

La couleur des jus, l'arôme, la saveur et la texture, facilement perçue par les consommateurs des produits alimentaires et la valeur nutritive, sont généralement considérés comme les principaux facteurs de la qualité des jus. Ils sont utilisés pour l'optimisation de la qualité du processus, sachant que les différentes conditions de température de chauffage et du temps conduisent à des effets similaires sur les micro-organismes et l'inactivation enzymatique (**Boutakiout, 2015**). La qualité organoleptique est un facteur d'acceptabilité des produits par le consommateur sans passer par les analyses physicochimiques, elle est surtout appréciée par les organes de sens. Cette appréciation ou la qualité organoleptique d'une boisson conservée présente un grand intérêt du fait qu'elle nous informe sur l'état du produit et le degré d'altération au cours de la conservation durant 21 jours.

Pendant la durée de stockage prolongé, les boissons formulées ont subi un contrôle de qualité organoleptique durant chaque période de conservation. Les couleurs enregistrées initialement sont: rose foncé, rouge pourpre. On note un brunissement (noircissement par oxydation) de la couleur dans la période [J7-J15] de conservation pour les échantillons exposés à la lumière, et la disparition totale de cette couleur dans la période [J15-J21]. L'appréciation donnée par rapport au goût, odeur et texture varie selon les échantillons testés. Lesquelles ont présenté des signes d'altération pour ceux exposés à la lumière dont un changement brutale est noté. Le goût est souvent légèrement acide et parfois sucré. Pour l'odeur et texture aucun changement est noté et aussi l'absence de dégagement gazeux durant toute la période de stockage à différentes conditions pour les autres échantillons.

Cette modification de couleur est essentiellement due à la destruction ou la transformation de pigments naturels (**Nout et al., 2003**) des anthocyanes (350mg/100g) (**Cissé et al., 2008**) de l'*H. sabdariffa*, des polyphénols et des carotènes qui composent les fraises et le citron. Pour les autres échantillons (étuvés à 30°C, mettaient à l'abri à 22°C, mettaient à l'ambient à 22°C et réfrigéraient à 4°C), aucun changement n'a été observé qui peut être expliqué par l'absence d'une altération microbienne. Les résultats microbiologiques expliquent, l'efficacité de traitement thermique de pasteurisation et aussi les bonnes conditions d'entreposage et de conservation (additifs).

L'ensemble des analyses physicochimiques et microbiologiques effectuées montrent la conformité des boissons formulées sur le plan microbiologique aux normes décrites par le **JORA (2017)** et la réglementation de l'entreprise. Cela montre que nos boissons ont été jugées stables durant la période de stockage.

Conclusion

Les analyses microbiologiques de l'eau de process nous montrent que ces derniers sont conformes aux normes décrites par le JORA 2017 et aussi aux exigences de l'entreprise. Les analyses physicochimiques nous montrent aussi une conformité aux normes décrites par le JORA 2011, ce qui témoigne du bon déroulement du processus d'épuration et de traitement de cette eau au niveau de l'unité IFRUIT.

Les analyses physicochimiques et microbiologiques des deux boissons de bissap élaborés (bissap citron-menthe et bissap fraise) ont présenté une absence totale des germes recherchés et donc des résultats satisfaisants et conformes ce qui signifie l'efficacité du traitement thermique de pasteurisation sur les microorganismes présents dans les matières premières (jus de citron et fraises naturelle).

Le contrôle de la stabilité des produits fini durant 21 jours au différentes conditions de stockage sur l'ensemble des analyses physico-chimiques (pH, degré Brix et l'acidité) et microbiologiques montrent la conformité sur le plan microbiologique de nos boissons aux normes décrites par le JORA 2017 et aux exigences de l'entreprise, et aussi la conformité sur le plan physicochimique aux normes adopté par l'entreprise IFRUIT, c'est à dire que nos produits ont été jugés stables durant la période de stockage. Ceci montre le rôle important et l'efficacité de l'acidité (conservateurs), le pH et aussi la pasteurisation dans la conservation de ces boissons. D'après les résultats de différents paramètres obtenus, les conditions de stockage estimé pour le jus produit sont les suivants: éviter l'exposition à la lumière, utilisation des emballages opaques tels que des bouteilles en plastique blanche ou canettes.

Des études plus approfondies sont essentielles dans le but d'apporter un complément à ce travail :

- L'évaluation de la qualité nutritionnelle, la composition chimique, dosage de la teneur en vitamine C, en caroténoïdes, en sels minéraux, en antioxydants...
- Une analyse sensorielle.
- La détermination de la DLC.

**Références
bibliographiques**

Références bibliographiques

A

Adeyemi DO. et Adewole OS. (2019). *Hibiscus sabdariffa* renews pancreatic β -cells in experimental type 1 diabetic model rats. *Morphologie* 103 (341): 80-93.

Adjoba K. (2016). Découvrez les 5 propriétés exceptionnelles du Bissap sur votre santé. Disponible sur le site : <https://www.afrikmag.com/decouvrez-bissap-proprietes-exceptionnelles-sante/>

Ahabar NH. (2012). Etude comparée de deux systèmes de culture (pluvial et irrigué) de la roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) dans la province du loba: évaluation du potentiel de production en calices. Université polytechnique de Bobo-Dioulasso (Burkina Faso).

Akim A., Ling LC., Rahmat A. et Zakaria ZA. (2011). Antioxidant and anti-proliferative activities of Roselle juice on caov-3, mcf-7, mda-mb-231 and hela cancer cell lines. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 5 (7): 957-965.

Ali BH., Wabel NA. et Blunden G. (2005). Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: A review. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 19 (5): 369-375.

Alshami I. et Alharbi AE. (2014). Antimicrobial activity of *Hibiscus sabdariffa* extract against uropathogenic strains isolated from recurrent urinary tract infections. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4 (4): 317-322.

APAB (Association des Producteurs Algériens de Boissons). (2011). Guide des bonnes pratiques d'hygiène. Industrie Algérienne des jus de fruits, nectar et produits dérivés, Algérie: 152.

B

Bahaeldeen BM., Abdelatif AS. et Abdelhafiz AD. (2012). Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L). In Sudan, Cultivation and Their Uses. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences* 1 (6): 48-54.

Bayoï JR., Djoulde DR., Maiwore J., Bakary D., Soppe Essome J., Noura B., Tcheme G., Tchio Sah R., Essia Ngang JJ. et Etoa FX. (2014). Influence du procédé de fabrication sur la qualité microbiologique du jus de « foleré » (*Hibiscus sabdariffa*) vendu dans trois villes du

Références bibliographiques

Cameroun : Maroua, Mokolo et Mora. *International Journal of Innovation and Applied Studies* 9 (2): 786–796.

Boutakiout A. (2015). Etude physico-chimique, biochimique et stabilité d'un nouveau produit: jus de cladode du figuier de Barbarie marocain (*Opuntia ficus-indica* et *Opuntia megacantha*). L'université de Sultan Moulay Slimane (Maroc).

Bule M., Albelbeisi HA., Nikfar S., Amini M. et Abdollahi M. (2020). The antidiabetic and antilipidemic effects of *Hibiscus sabdariffa*: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Food Research International* 130: 01-11.

C

Cid-Ortega S. et Guerrero-Beltran JA. (2015). Roselle calyces (*Hibiscus sabdariffa*) an alternative to the food and beverages industries: A Review. *Journal of Food Science and Technology* 52 (11): 6859-6869.

Ciqual-Anses. (2020). Table de composition nutritionnelle des aliments. Disponible sur le site: <https://ciqual.anses.fr/>

Cissé M. (2010). Bissap (*Hibiscus sabdariffa L.*). Ecole supérieure polytechnique de Dakar Université Cheikh Anta Diop (Sénégal).

Cissé M., Dornier M., Sakho M., Mar Diop C., Reynes M. et Sock O. (2009). La production du bissap (*Hibiscus sabdariffa L.*) au Sénégal. *Fruits* 64: 111-124.

Cissé M., Dornier M., Sakho M., Ndiaye A., Reynes M. et Sock O. (2008). Le bissap ; composition et principales utilisations. *Fruits* 64 (3): 179-193.

D

Da-Costa-Rocha I., Bonnlaender B., Sievers H., Pischel I. et Heinrich M. (2014). *Hibiscus sabdariffa L.* A phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry* 165: 424-443.

E

Endrias A. (2006). Bio-raffinage de plantes aromatiques et médicinales appliqué à *L'Hibiscus sabdariffa L.* et à *l'Artemisia annua*. École Doctorale : Science des Procédés Spécialité : Sciences des Agroressources (France).

F

FOOD-INFO. (1999). Disponible sur le site: <http://www.food-info.net/fr/qa/qa-fp65.htm>.

Références bibliographiques

Fullerton M., Khatiwada J., Johnson JU., Davis S. et Williams LL. (2011). Determination of antimicrobial activity of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) on *Esherichia coli* O157:H7 isolated from food, veterinary, and Clinical Samples. *Journal of Medicinal Food* 14 (9): 950-956.

G

Garbi MI., Mohammed SF., Magzoub AA., Hassabelrasoul RM., Saleh MS., Badri AM., Ibrahim TI., Elchikh AA. et Kabbashi AS. (2017). *In vitro* anti-inflammatory properties of methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa* flowers. *International Journal of Home Science* 3 (1): 234-237.

Gomaa RBA. et Rashed NM. (2016). Post-harvest studies on reducing losses and maintaining quality of packaging Roselle calyxes. *Journal of Sustainable Agricultural Sciences* 42 (4): 68-86.

Goule G., Djibril D. et Peter H. (2012). Manuel de formation sur le bissap (*Hibiscus sabdariffa*). *Programme sénégal-allemand d'Appui à la Décentralisation et au développement Local (PRODDEL) Dakar/Kaolack/Fatick/Kaffrine*: 24.

Gueye M. (2005). Le bissap une plante d'avenir. *Ruralité* (1): 14-17.

Guiraud JP. (2003). Microbiologie alimentaire. ed *Dunod*, Paris : 651.

Gurak PD., Cabral LMC., Rocha-Leao MHM., Matta VM. et Freitas SP. (2010). Quality evaluation of grape juice concentrated by reserve osmosis. *Journal of food Engineering* 96 (3): 421-426.

H

Hopkins AL., Lamm MG., Funk LJ. et Ritenbaugh C. (2013). *Hibiscus sabdariffa* L. in the treatment of hypertension and hyperlipidemia. *Fitoterapia* 85: 84–94.

I

Iberraken Z. (2016). Analyse physicochimique et microbiologique d'un jus IFRUIT. Mémoire de Master II. Université A. MIRA (Béjaïa).

Inuwa I., Ali BH., Al-Lawati I., Beegam S., Ziada A. et Blunden G. (2012). Long-term ingestion of *Hibiscus sabdariffa* calyx extract enhances myocardial capillarization in the spontaneously hypertensive rat. *Experimental Biology and Medicine* 237 (5): 563-569.

Références bibliographiques

Islam MM. (2019). Food and medicinal values of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. Linne malvaceae) plant parts: a review. *Open Journal of Nutrition and Food Sciences* 1(1003): 14-20.

ISO 21527-1 (2008). Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement des levures et moisissures - Partie 1: Technique par comptage des colonies dans les produits à activité d'eau supérieure à 0,95.

ISO 4832 (2006). Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes – Méthode par comptage des colonies.

ISO 4833-1 (2013). Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes - Partie 1: Comptage des colonies à 30 degrés C par la technique d'ensemencement en profondeur.

J

Jabeur I., Pereira E., Barros L., Calhella RC., Soković M., Oliveirab PP., Beatriz M. et Ferreira ICFR. (2017). *Hibiscus sabdariffa* L. as a source of nutrients, bioactive compounds and colouring agents. *Food Research International* 100: 717-723.

Jade B. (2013). Guide d'animation sur la qualité du bissap, *UGCPA/BM, Dédougou*, France: 4.

Journal Officiel de la République Algérienne N° 51. (2013). Arrêté du 21 Moharram 1434 correspondant au 5 décembre 2012 rendant obligatoire la méthode de détection et de dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'eau par filtration sur membrane.

K

Konan AH. (2016). Altération microbienne des boissons. Université NANGUI ABROGOUA (Côte d'Ivoire).

Kone D. (2014). Sélection *in vitro* de cals à haut potentiel de production d'anthocyanes chez la roselle [*Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae)]. Université NANGUI ABROGOUA (Côte d'Ivoire).

L

Lim YC., Budin SB., Othman F., Latip J. et Zainalabidin S. (2016). Roselle polyphenols exert potent negative inotropic effects via modulation of intracellular calcium regulatory channels in isolated rat heart. *Cardiovascular Toxicology* 17 (3): 251-259.

Références bibliographiques

Lin HH., Chan KC., Sheu JY., Hsuan SW., Wang CJ. et Chen JH. (2012). *Hibiscus sabdariffa* leaf induces apoptosis of human prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Food Chemistry* 132 (2): 880-891.

Lusida TTE., Hermanto B. et Sudarno S. (2017). The antibacterial effect of Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) extract against *Staphylococcus epidermidis* *in vitro*. *Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease* 6 (4): 88-91.

M

Marciel LG., Do Carmo MAV., Azevedo L., Daguer H., Molognoni L., De Almeida MM., Granato D. et Rosso ND. (2018). *Hibiscus sabdariffa* anthocyanins-rich extract: chemical stability *in vitro*, antioxidant and anti-proliferative activities. *Food and Chemical Toxicology* (113): 187-197.

Mariod AA., Tahir HE. et Mahunu GK. (2021). Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Chemistry, Production, Products and Utilization*: 274.

Musa A., Tahir HE., Gasmalla MAA., Mahunu GK. et Mariod AA. (2021). Volatile compounds and phytochemicals of *Hibiscus sabdariffa* in Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Inde: Academic Press*. pp: 91-111.

N

Ndarubu TA., Chiamaka OS., Alfa S., Aishatu M., Chinedu OE., Wenawo DL., Adenike AR., Bashir L. et Eustace BB. (2019). Phytochemicals, hypoglycemic and hypolipidemic effects of methanol leaf extract of *Hibiscus sabdariffa* in alloxan induced diabetic rats. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences* 8 (3): 70-78.

Ndiaye NA., Dieng M., Kane A., Cissé M., Montet D. et Toure NC. (2015). Diagnostic de caractérisation de boissons et de concentrés d'*Hibiscus sabdariffa* L. *Afrique SCIENCE* 11 (3): 197-210.

NF EN ISO 7899-2 (2000). Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux - Partie 2: méthode par filtration sur membrane.

NF EN ISO 9308-1 (2000). Qualité de l'eau – Recherche et dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes – Partie 1: Méthode par filtration sur membrane.

Références bibliographiques

NF T 906415 (1985). Essais des eaux - Recherche et dénombrement des spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices et de {*Clostridium*} sulfito-réducteurs - Méthode générale par incorporation en gélose en tubes profonds.

Nout R., Honnhonigan J-D. et Boekel T-V. (2003). Les aliments: Transformation, conservation et qualité. Ed. CTA, Germany: 32-42, 134-261, 109-119.

O

Obouayeba AP., Meité S., Boyvin L., Yeo D., Kouakou TH. et N'Guessan JD. (2015). Cardioprotective and anti-inflammatory activities of a polyphenols enriched extract of *Hibiscus sabdariffa* petal extracts in wistar rats. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 4 (1): 57-63.

Ojulari OV., Lee SG. et Nam J-O. (2019). Beneficial effects of natural bioactive compounds from *Hibiscus sabdariffa* L. on obesity. *Molecules* 24 (1): 210.

Olaleye BO. et Tolulope M. (2007). Cytotoxicity and antibacterial activity of methonolic extract of *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Medicinal Plants Research* 1 (1): 09-13.

Osei-Kwarteng M., Gweyi-Onyango JP. et Mahunu GK. (2021). Harvesting, storage, postharvest management, and marketing of *Hibiscus sabdariffa* in Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). Inde: *Academic Press*. pp: 15-31.

P

Peter EL., Rumisha SF., Mashoto KO. et Malebo HM. (2014). Ethno-medicinal knowledge and plants traditionally used to treat anemia in Tanzania: A cross sectional survey. *Journal of Ethnopharmacology* 154 (3): 767-773.

Priyanka D. et Dhanavel D. (2020). A review of medicinal and nutritional values and mutation breening of *Hibiscus sabdariffa* L. *International Journal of Botany Studies*. 5 (3): 157-164.

Q

Quansah L., Mahunu GK., Tahir HE., Tibiru Apaliya M., Abdalbasit AM. et Osei-Kwarteng M. (2021). *Hibiscus sabdariffa* extract: antimicrobial prospects in food pathogens and mycotoxins management in Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). Ed *Academic Press* pp: 215-230.

R

Références bibliographiques

Ramos B., Miller FA., Brandão TRS., Teixeira P. et Silva CLM. (2013). Fresh fruits and vegetables—an overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 20: 1-15.

S

Sáyago-Ayerdi SG., Arranz S., Serrano J. et Goñi I. (2007). Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in Roselle flower (*Hibiscus sabdariffa L.*) beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (19): 7886-7890.

Sidibe f. (2021). Valorisation des ressources de la médecine traditionnelle. Université des sciences, des techniques et des technologies de Bamako.

Singh P., Khan M. et Hailemariam H. (2017). Nutritional and health importance of *Hibiscus sabdariffa*: A review and indication for research needs. *Journal of Nutritional Health & Food Engineering* 6 (5): 02-12.

Soejoenoes A., Nisa R. et Wahyuni S. (2017). Effect of Roselle (*hibiscus sabdariffa*) on changes in hemoglobin levels in pregnant women with anemia taking iron supplement. *Belitung Nursing Journal* 3 (6): 771-777.

Sogo T., Terahara N., Hisanaga A., Kumamoto T., Yamashiro T., Wu S. et Hou DX. (2015). Anti-inflammatory activity and molecular mechanism of delphinidin 3-sambubioside, a *Hibiscus* anthocyanin. *BioFactors (Oxford, England)* 41 (1): 58-65.

Sulistyani H., Fujita M., Miyakawa H. et Nakazawa F. (2016). Effect of Roselle calyx extract on *in vitro* viability and biofilm formation ability of oral pathogenic bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 9 (2): 119-124.

T

Thiam-Donde F. (2013). Evaluation de la qualité de produits à base de calices d'*Hibiscus sabdariffa L.* (bissap). Ecole inter-états des sciences et médecine vétérinaires (Dakar).

Tuan-Azlan TNN., Hamzah Y. et Mohd-Abd-Majid HA. (2020). Effect of gum arabic (*Acacia senegal*) addition on physicochemical properties and sensory acceptability of roselle juice. *Food Research* 4 (2): 449-458.

W

Walton RJ., Whitten DL. et Hawrelak JA. (2016). The efficacy of *Hibiscus sabdariffa* (rosella) in essential hypertension: A systematic review of clinical trials. *Australian Journal of Herbal Medicine* 28 (2): 48-51.

Z

Zhen J., Villani TS., Guo Y., Qi Y., Chin K., Pan MH., Ho CT., Simon JE. et Wu Q. (2016). Phytochemistry, antioxidant capacity, total phenolic content and anti-inflammatory activity of *Hibiscus sabdariffa* leaves. *Food Chemistry* 190: 673-680.

Annexes

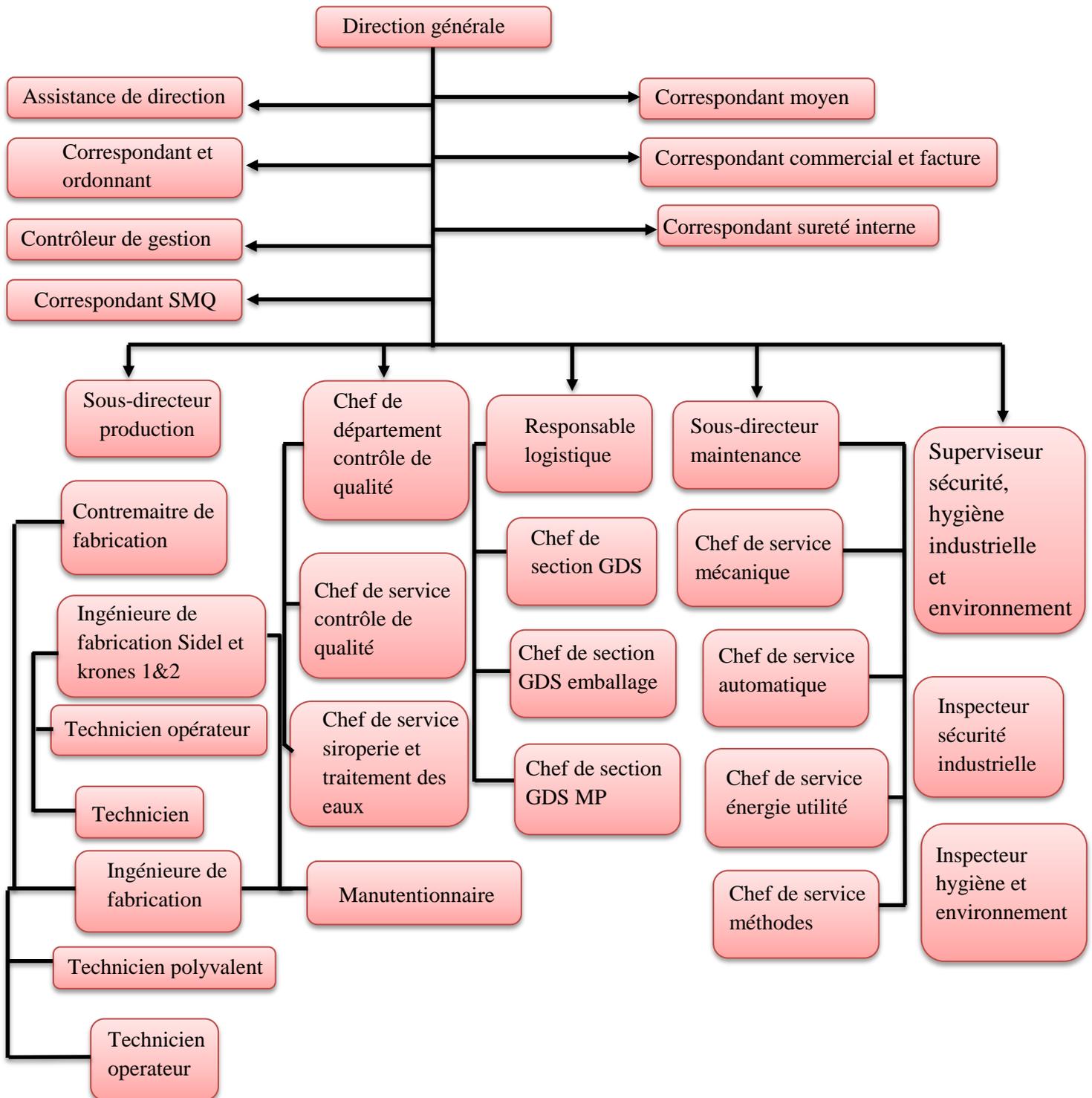


Figure 01: L'organisation générale de l'unité IFRUIT.

Annexe 02 :

Tableau I: Valeurs minimales, moyennes et maximales de différentes caractéristiques des calices d'*H. sabdariffa* (Cissé et al., 2008).

Type de données	Unités	Minimales	Moyennes	Maximales
Humidité	g/100g	84,5	86,34	89,50
Protéines		0,90	6,59	17,90
Lipides		0,10	2,27	3,90
Fibres		2,50	8,75	12
Cendres		6,50	6,63	6,8
Glucides		3,28	8,07	12,30
Calcium	mg/100g	1,26	93,96	213
Fer		2,90	17,16	37,8
Phosphore		40	191,08	312,57
Acide malique		0,12	1,36	2,70
Acide ascorbique		6,70	71,98	141,09
Anthocyanes		150	350	1500

Tableau II: Les résultats physico-chimiques des boissons finis.

Paramètre	BCM	BF	Bissap	Normes de l'entreprise
pH	2,51	2,95	2,30	$\leq 3 \pm 0,8$
Acidité (g/l)	3,20	3,45	1,8	$\leq 4 \pm 0,8$
Extrait sec soluble (°B)	12,6	12,1	01	$\leq 13 \pm 0,8$

Tableau III: Composition nutritionnelle pour 100g de menthe fraîche (Ciqual-Anses, 2020).

Constituants	Teneur moyenne	Constituants	Teneur moyenne
Eau (g)	82.1	Sodium (mg)	30.5
Protéines (g)	3.52	Zinc (mg)	1.1
Sucres (g)	5.3	Bêta-carotène (µg)	740
Lipides (g)	0.84	Vitamine E (mg)	5
Fibres (g)	7.4	Vitamine C (mg)	22.6
Calcium (mg)	221	Vitamine B1 (mg)	0.08
Cuivre (mg)	0.28	Vitamine B2 (mg)	0.22
Fer (mg)	8.48	Vitamine B3 (mg)	1.33
Magnésium (mg)	71.5	Vitamine B5 (mg)	0.29
Phosphore (mg)	66.5	Vitamine B6 (mg)	0.14
Potassium (mg)	514	Vitamine B9 (µg)	110

Tableau IV: Composition nutritionnelle pour 100g de fraise crue (Ciqual-Anses, 2020).

Constituants	Teneur moyenne	Constituants	Teneur moyenne
Eau (g)	90.3	Sodium (mg)	<5
Protéines (g)	0.63	Zinc (mg)	0.11
Sucres (g)	5.6	Bêta-carotène (µg)	<5
Lipides (g)	<0.5	Vitamine E (mg)	0.3
Fibres (g)	3.8	Vitamine C (mg)	54
Calcium (mg)	18	Vitamine B1 (mg)	<0.015
Cuivre (mg)	0.02	Vitamine B2 (mg)	<0.01
Fer (mg)	0.19	Vitamine B3 (mg)	0.21
Magnésium (mg)	12	Vitamine B5 (mg)	0.13
Phosphore (mg)	23	Vitamine B6 (mg)	0.04
Potassium (mg)	140	Vitamine B9 (µg)	98.9
Fructose (g)	3.3	Glucides (g)	6.03
Glucose (g)	2.3	Amidon (g)	<0.35

Tableau V: Composition nutritionnelle pour 100g de jus de citron pur (Ciqual-Anses, 2020).

Constituant	Teneur moyenne	Constituant	Teneur moyenne
Eau (g)	92.5	Zinc (mg)	0.06
Protéines (g)	0.4	Bêta-Carotène (µg)	2
Glucides (g)	6.1	Vitamine E (mg)	0.15
Lipides (g)	0.29	Vitamine C (mg)	24.8
Sucre (g)	2.4	Vitamine B1 (mg)	0.041
Fibres (g)	0.4	Vitamine B2 (mg)	0.009
Calcium (mg)	11	Vitamine B3 (mg)	0.2
Fer (mg)	0.13	Vitamine B5 (mg)	0.091
Magnésium (mg)	8	Vitamine B6 (mg)	0.043
Phosphore (mg)	9	Vitamine B9 (mg)	10
Potassium (mg)	102	Sodium (mg)	21

Annexe 03: Composition des milieux de cultures.

Slanetz et Bartley:

Eau distillé.....	1000ml
Tryptophane.....	20g
Extrait de levure	5g
Glucose.....	2g
Hydrogénophosphate dipotassique (K ₂ HPO ₄).....	4g
Azoture de sodium.....	0,4g
Agar-agar.....	8 à 18 g

Le milieu prêt à l'emploi contient triphényl-2,3,5-tétrazolium chlorures (TTC) : 1 g.

pH final à 25 °C : 7,2 ± 0,1.

Gélose lastosée au TTC et Heptadécylsulfate de sodium:

Eau distillé.....	1000ml
Peptone.....	10 g
Extrait de levure.....	6 g
Extrait de viande.....	5 g
Lactose.....	20 g
Heptadécylsulfate de sodium (tergitol 7).....	0,2 g
Bleu de bromothymol.....	0,05 g
Agar-agar (en poudre ou en flacons).....	15 à 25g

Le milieu prêt à l'emploi contient triphényl-2,3,5-tétrazolium chlorures (TTC) : 0,05g.

pH final à 25 °C : 7,2 ± 0,1.

Cetrimide:

Eau distillé.....	1000ml
Peptone de gélatine.....	16 g
Hydrolisat de caséine.....	10 g
Chlorure de magnésium.....	1,4 g
Sulfate de potassium.....	10 g
Cetrimide (bromure d'hexadécyltrimethyl ammonium).....	0,2 g
Acide nalidixique	0,015 g
Glycérol.....	10 ml
Gélose.....	11 à 18 g

pH final à 25 °C: 7,1 ± 0,2.

Viande-foie:

Eau distillé.....	1000 ml
Peptone viande-foie.....	30 g
Glucose.....	2 g
Amidon soluble.....	2 g
Sulfite de sodium.....	2,5 g
Citrate ferrique ammoniacal.....	0,50 g
Agar-agar.....	11 g

pH final à 25 °C : 7,6 ± 0,2.

Dichloran Rose Bengale Chloramphenicol (DRBC):

Eau distillé.....	1000 ml
Polpeptone.....	5 g
Glucose.....	10 g
Sulfate de magnésium (MgSO ₄), H ₂ O.....	0,5 g
Sulfate de zinc (ZnSO ₄), 7H ₂ O.....	10 mg
Sulfate de cuivre (CuSO ₄), 5H ₂ O.....	5 mg
Tergitol.....	1 mg
Phosphate monopotassique.....	1 g
Dichloran (dichloro-2,6-nitro-aniline).....	2 mg
Chloramphenicol.....	50 mg
Rose bengale.....	25 mg
Chlorohydrate de chlortetracycline.....	50 mg
Agar-agar bactériologique.....	12,4 g

pH final à 25 °C: 5,6 ± 0,2.

Plant Count Agar (PCA):

Eau distillé.....	1000 ml
Tryptone	5 g
Extrait autolytique de levure	2,5g
Glucose	1g
Agar-agar bactériologique	12 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,0 ± 0,2.

Eau peptonée:

Eau distillé.....1000 ml

Peptone.....1 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,0 ± 0,2.

Violet Red Bile Lactose agar (VRBL):

Eau distillé.....1000 ml

Peptone pepsique de viande 7,0 g

Extrait autolytique de levure 3,0 g

Lactose 10,0 g

Sels biliaries 1,5 g

Chlorure de sodium 5,0 g

Rouge neutre 30,0 mg

Cristal violet 2,0 mg

Agar-agar bactériologique 12,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,4 ± 0,2.

Honey:

Eau distillé.....1000 ml

Extrait de levure.....5 g

Glucose.....10 g

Saccharose.....230ml

Agar.....18 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C: 5,5.

Résumé

Notre travail consiste en un essai de fabrication d'une boisson de bissap ainsi qu'à l'étude de différents paramètres physicochimiques, microbiologiques et la réalisation d'un test de stabilité. Au cours de cette étude, nous avons constaté que les résultats obtenus pour les analyses physico-chimiques (TA, TAC, TH, pH, Conductivité et les Chlorures) et microbiologiques (Coliformes totaux, *E. coli*, *P.aeruginosa*, CSR, Streptocoques fécaux) de l'eau de process sont conformes aux normes adoptées par JORA (2011) et JORA (2017) respectivement. Concernant l'analyse des deux boissons élaborées (bissap fraise, bissap citron-menthe) il a été révélé que ces derniers présentent des résultats satisfaisants que ce soit sur le plan microbiologique, physicochimique, ainsi une absence totale des germes recherchés (Levure et moisissure, levure osmophile, FTAM et Coliformes) qui sont conformes aux normes décrites par JORA (2017) et aussi aux exigences de la réglementation de l'entreprise. On ajoute à ça, la conformité des résultats des paramètres physicochimiques (pH, degré Brix et acidité) étudiés aux normes adoptées par l'entreprise «IFRUIT». Un test de stabilité durant 21 jours pour des échantillons à différentes conditions de stockages (à 30°C, à 22°C à l'abri du soleil, au soleil et à température ambiante) dont il a été constaté que les résultats obtenus pour les analyses physicochimiques et microbiologiques sont satisfaisants, ainsi absence totale des germes recherchés (Levure et moisissure, levure osmophile, FTAM et Coliformes) qui sont conformes aux normes décrites par le JORA (2017) et la réglementation de l'entreprise, en plus s'ajoute la stabilité des analyses physicochimiques (pH, degré Brix et acidité).

Mots clés: Boisson bissap, analyses physicochimiques, analyses microbiologiques, *Hibiscus sabdariffa*, stabilité.

Abstract

Our work consists of a test of the manufacture of a bissap drink as well as the study of various physicochemical and microbiological parameters and the performance of a stability test. During this study, we noted that the results obtained for the physicochemical (TA, TAC, TH, pH, Conductivity and Chlorides) and microbiological (Total Coliforms, *E. coli*, *P.aeruginosa*, CSR, faecal streptococci) of the process water comply with the standards adopted by JORA (2011) and JORA (2017) respectively. Regarding the analysis of the two drinks produced (strawberry bissap, lemon-mint bissap), it was revealed that the latter presented satisfactory results on the microbiological and physicochemical level, as well as a total absence of the desired germs (yeast and mold, osmophilic yeast, FTAM and Coliforms) which comply with the standards described by JORA (2017) and also with the requirements of company regulations. To this is added the compliance of the results of the physicochemical parameters (pH, Brix degree and acidity) studied with the standards adopted by the "IFRUIT" company. A stability test lasting 21 days for samples at different storage conditions (at 30 ° C, at 22 ° C sheltered from the sun, in the sun and at room temperature) for which it was noted that the results obtained for the physicochemical and microbiological analyzes are satisfactory, thus total absence of the desired germs (yeast and mold, osmophilic yeast, FTAM and Coliforms) which comply with the standards described by JORA (2017) and company regulations, in addition to the stability of physicochemical analyzes (pH, Brix degree and acidity).

Key words: Bissap drink, physicochemical analyzes, microbiological analyzes, *Hibiscus sabdariffa*, stability.

