

Université
Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem



عبد الحميد بن باديس
مستغانم
علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

N°...../SNV

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

En vue de l'obtention du diplôme de master

Spécialité: **EXPLOITATION DES ÉCOSYSTÈMES MICROBIENS LAITIERS**

THÈME

**Essai de conservation d'un yaourt brassé par
l'extrait de myrte**

Présenté par

Bensmain Kawther

Soutenu le : **06 /07/2017**

DEVANT LE JURY

Président	MR. NEMMICHE	Maître de Conférences à l'Université de Mostaganem
Examinatrice	MME TAHLAITI	Maître de conférences à l'Université de Mostaganem
Encadreur	MME AICHA HENNIA	Maître assistante à l'Université de Mostaganem

Thème réalisé au Laboratoire de Laboratoire des Sciences Techniques et de Production Animale

Année universitaire 2016-2017

Remerciements

Au terme de ce mémoire de fin d'étude, mes remerciements vont tout d'abord à Dieu le tout puissant, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à M^{me} Hennia Aicha, Maître de conférences à l'Université de Mostaganem, pour m'avoir encadrée, orientée, aidée et conseillée.

Je remercie également M^r Nemmiche Said, Maître de Conférences à l'Université de Mostaganem, d'avoir voulu présider le jury d'évaluation de mon mémoire de master et M^{me} Tahlalti, Maître assistante à l'Université de Mostaganem, d'avoir voulu examiner mon présent travail.

J'adresse mes sincères remerciements à M^r Dahou Amine, Maître assistant et M^r Asri benbouziène, Maître de conférences à l'Université de Mostaganem, qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé mes réflexions et ont accepté à me rencontrer et répondre à mes questions durant mes recherches.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble du personnel de la laiterie « vallée des jardins » pour leurs informations, leurs conseils et pour l'intérêt qu'ils ont porté à mes travaux.

Dans l'impossibilité de citer tous les noms, mes sincères remerciements vont à tous ceux et celles, qui de près ou de loin, ont permis par leurs conseils et leurs compétences la réalisation de ce mémoire.

Enfin, je n'oserais oublier de remercier M^r Homrani, pour le travail énorme qu'il effectue pour nous créer les conditions les plus favorables pour le déroulement de nos études.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à :

Mes chers parents ma mère et mon père pour leur patience, amour, soutien et encouragement toute au long de mes études.

Mon très cher frère « Nadji ».

Mon cher mari qui n'a jamais cessé de croire en moi, et à ma fille « Alae »

Ma belle-famille pour le respect qu'ils m'ont toujours accordé.

Ma chère copine « Roumaïssa », ainsi que toutes mes collègues de master EEML pour les beaux jours que nous avons passés ensemble.

Résumé :

L'objectif de ce travail est d'étudier les effets de l'incorporation de l'huile essentielle de *Myrtus communis* L. sur la qualité du yaourt brassé préparé et fermenté par des ferments lactiques lyophilisés au niveau du laboratoire. L'huile essentielle a été incorporée aux concentrations de 2,5%, 5% et 10% au yaourt pendant le brassage. Ces effets ont été évalués par le suivi de l'évolution des paramètres physico-chimiques et microbiologiques pendant 21 jours de stockage à +4°C. La présence de l'huile essentielle dans le yaourt brassé à raison de 2,5%, 5% et 10% a conduit à une augmentation de la viabilité des *St. thermophilus* de l'ordre de $33,7 \times 10^7$, 31×10^7 et $53,2 \times 10^7$ UFC/ml dès la première semaine du stockage puis une diminution significative pour 5% et 10% (les doses les plus élevées) de l'ordre de 11×10^6 et 19×10^6 UFC/ml, respectivement et ce en fin de stockage. Par contre, l'ajout de l'huile essentielle à faible dose de 2,5% a démontré une faible diminution $1,3 \times 10^7$ UFC/ml atteinte en fin de stockage comparable à celle du témoin ($1,2 \times 10^7$ UFC/ml). Quant à l'acidité, les résultats obtenus ont montré une baisse de pH (de 4,6 à 3,9 pour 10%, de 4,6 à 4,2 pour 5% et de 4,6 à 4,35 pour 2,5% d'HE) et une augmentation de l'acidité de 85 à 135°D pour 10% et de 84 à 112°D pour 5% à l'exception de 2,5% qui a enregistré une faible augmentation d'acidité (de 81 à 94° D) par rapport au témoin (de 83 à 125° D). Donc l'ajout de cette dose a permis de stabiliser la qualité microbiologique du yaourt brassé tout en allongeant sa durée de conservation. Sur le plan sensoriel, les yaourts naturels (témoins avec et sans sucre) ont été les préférés parmi tous les échantillons et l'aromatisation avec l'HE du myrte à une dose de 5% semble être la moins appréciée voire inacceptable à cause de son arôme fort, odeur prononcée et goût accentué.

Mots-clés : Huile essentielle, *Myrtus communis* L., yaourt, *St. thermophilus*, *Lb. bulgaricus*, acidité.

Summary:

The objective of this work is to study the effects of the incorporation of *Myrtus communis* L. essential oil on the quality of stirred yogurt prepared and fermented by freeze-dried lactic ferments in the laboratory. The essential oil was incorporated at concentrations of 2.5%, 5% and 10% in the yogurt during the stirring process. These effects were evaluated by monitoring the evolution of the physico-chemical and microbiological parameters during 21 days of storage at + 4 ° C. The presence of the essential oil at the concentrations of 2.5%, 5% and 10% in the stirred yogurt led to an increase of *St. thermophilus* viability in the order of 33.7×10^6 , 31×10^6 and 53.2×10^6 UFC/ml from the first week of storage and then a significant decrease with the highest doses of 5% and 10% in the order of 11×10^6 and 19×10^6 CFU/ml, respectively, at the end of storage. On the other hand, the addition of the essential oil at a low dose of 2.5% showed a slight decrease of 1.3×10^7 CFU/ml at the end of storage comparable to that of the control (1.2×10^7 CFU/ml). As for the acidity, the results obtained showed a decrease in pH (from 4.6 to 3.9 for 10%, from 4.6 to 4.2 for 5% and from 4.6 to 4.35 for 2,5% of EO) and an acidity increase of 85 to 135 ° D for 10% and 84 to 112 ° D for 5% with exception for 2.5% (81 to 94 ° D) compared to the control (83 to 125 ° D). Thus the addition of this dose made it possible to stabilize the microbiological quality of the stirred yogurt while extending its shelf life. Sensorially, natural yogurts (sugar-free and with sugar) were the favorites among all samples and aromatization with myrtle EO at a dose of 5% seems to be the least appreciated or even unacceptable because of its strong aroma, pronounced odor and accentuated taste.

Keywords: Essential oil, *Myrtus communis* L., yoghurt, *St. thermophilus*, *Lb. bulgaricus*, acidity.

الهدف هذا	هو	دمج الزيت	<i>Myrtus communis</i> L	الياغورت
تحضيره	بواسطة خميرة	.	تركيزات 2.5	10 5
الياغورت أثناء	.	تغييرات	المعايير الميكروبيولوجية الفيزيائية	
والكيميائية	21 يوما	التخزين 4	الياغورت بنسبة 2.5	10 5
زيادة	<i>Streptococcus thermophilus</i>	مئوية.	53,2x10 ⁷ , 31x10 ⁷ , 33,7x10 ⁷	
قابلية				
شديد	نهاية	التخزين	11 x10 ⁶ et 19x10 ⁶ .	
2.5	أظهرت	طفيف في قابلية هذه الاخيرة	الشاهد	1.2x10 ⁷
.	للموضه، بينت النتائج ارت	سريع	زيادة	10 5
	125° D 135°D 112°D	2.5	94° D	
الزيت	قليلة	نوعية الياغورت	تخزينه	زيادة
	الياغورت الطبيعي	والغير	بين	العينات والياغورت
تقدير	غير	القوية	.	

المفتاحية الزيت *Lb. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* *Myrtus communis* L

سية

Sommaire

Remerciement

Dédicace

Résumé

Summury

Introduction

Partie 1 : synthèse bibliographique

Chapitre 1. Les bactéries lactiques et leurs applications dans la fabrication du yaourt

I. Les bactéries lactiques

Généralités sur les bactéries lactiques	1
1.1 Historique	1
1.2 Définition.....	1
2.Principales voies fermentaires des bactéries lactiques	1
2.1 Voie homofermentaire ou EMP.....	2
2.2 Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphates	2
3. Caractéristiques générales des bactéries lactiques.....	4
3.1 Le genre Streptococcus.....	4
3.2 Le genre Lactobacillus.....	4
4.1 L'espèce Lactobacillus bulgaricus	5
4.2 L'espèce Streptococcus thermophilus	6
4.3 La proto-coopération entre St. thermophilus et Lb. bulgaricus	8
4.3.1. Les phénomènes de coopération.....	9
4.4 Aptitudes technologiques des bactéries du yaourt.....	17
4.4.1. Aptitude acidifiante	17
4.4.2. Aptitude protéolytique.....	18
4.4.3. Aptitude lipolytique.....	18
4.4.4. Aptitude aromatisante.....	18
4.4.5. Aptitude texturante	18
4.4.6. Activité antimicrobienne	19
5. Applications industrielles des bactéries lactiques	19
Le yaourt et sa technologie.....	20
1. Le lait fermenté.....	20

2. Définition et données sur le yaourt.....	20
3. Les critères de qualité du yaourt pris en compte par le <i>Codex</i>	21
4. Technologie de fabrication du yaourt.....	23
5. Qualité du yaourt au cours de la conservation.....	28
5.1 Qualité physico-chimique.....	29
5.2 Qualité microbiologique	29
5.3 Qualité organoleptique	30
Chapitre 2. L'huile essentielle de <i>Myrtus communis</i> L.	32
1. Histoire de la plante <i>Myrtus communis</i> L.	32
2. Aspect économique.....	32
3. Etude botanique de <i>Myrtus communis</i> L.	32
3.1 Généralités sur la famille des Myrtacées	32
3.2 L'espèce <i>Myrtus communis</i> L.	33
4. Utilisations thérapeutiques et culinaires du myrte.....	34
5. Composition phytochimique de <i>Myrtus comunis</i> L.....	36
5.1. Les huiles essentielles.....	37
5.1.1. Définition.....	37
5.1.2. Composition chimique des huiles essentielles	38
6. Activités biologiques des huiles essentielles de <i>Myrtus comunis</i> L.	40
6.1. Effet antibactérien.....	40
6.2. Effet antifongique	41
6.3. Effet antiviral.....	42
6.4. Effet anti-inflammatoire	42
6.5. Toxicité.....	43
7. Procédés d'extraction des huiles essentielles	43
<u>Partie 2 : partie expérimentale</u>	
Matériels et Méthodes	
1. Objectif de l'étude	46
2. Matériel.....	46
2.1. Matériel végétal	46
2.2 Matériel biologique	46
2.3. Appareillage de laboratoire	47
2.4. Milieux de culture.....	48

2.5. Réactifs chimiques et autres produits	48
3. Méthodes	49
3.1 Extraction de l'huile essentielle.....	49
3.2 Préparation des dilutions de l'huile essentielle.....	50
3.3 Essai de fabrication du yaourt brassé à l'échelle du laboratoire	51
3.4. Addition de l'huile essentielle dans le yaourt brassé.....	52
3.5. Analyses physico-chimiques, microbiologiques et sensorielles du yaourt brassé.....	52
3.5.1 Les paramètres physicochimiques	52
3.5.2 Paramètres microbiologiques	53
3.5.3 Analyses organoleptiques ou sensorielles	55
Résultats et discussions	57
1. Résultats	
1.1 Rendement en huile essentielle du myrte	57
1.2 Analyses microbiologiques, physico-chimiques et sensorielles du yaourt brassé.....	57
1.2.1 Analyses microbiologiques.....	57
1.2.2 Analyses physico-chimiques	61
1.2.3 Analyse sensorielle du yaourt.....	63
2. Discussion	64
Conclusion	67
Annexes	68
Références bibliographiques	

Liste des tableaux

Tableau 1. Récapitulatif des principales études effectuées sur les facteurs stimulant <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ou <i>Streptococcus thermophilus</i> pour la production d'acide lactique.....	12
Tableau 2. Description des ferments lactiques lyophilisés étudiés	47
Tableau 3. Les doses testées de l'huile essentielle	50
Tableau 4. Principaux caractères de <i>St. thermophilus</i>	58
Tableau 5. Dénombrement de la FTAM du yaourt brassé.	61
Tableau 6. Nombre de colonies comptées de <i>St. Thermophilus</i>	70
Tableau 7. Les valeurs d'acidité titrable exprimée en degré Dornic(D°).....	70
Tableau 8. Les valeurs du pH mesuré lors du stockage.	70
Tableau 9. Tableau d'analyse sensorielle comparative des yaourts brassés.	71

Liste des figures

Figure 1. Voies homofermentaire et hétérofermentaire de la dégradation du glucose.....	3
Figure 2. Aspect des levains thermophiles du yoghourt.....	7
Figure 3. Proto-copération entre <i>S.thermophilus</i> et <i>Lb.bulgaricus</i>	9
Figure 4. Production d'acide lactique de cultures mixtes de <i>Streptococcus thermophilus</i> et de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> et des cultures pures correspondantes.....	11
Figure 5. Diagramme de fabrication du yaourt.....	23
Figure 6. <i>Myrtus communis</i> L.	34
Figure 7. Cinq monoterpénoïdes à base de sesquiterpènes.....	37
Figure 8. Ferments lactiques thermophiles pour la fabrication d'un yaourt.....	47
Figure 9. Dispositif d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau	50
Figure 10. Préparation des dilutions de l'HE.....	51
Figure 11. Préparation du yaourt	52
Figure 12. Addition de l'HE.....	51
Figure 13. Addition des différentes doses de l'huile essentielle du Myrte.....	52
Figure 14. Analyse sensorielle du yaourt brassé préparé à l'échelle du laboratoire	56
Figure 15. L'huile essentielle de <i>Myrtus communis</i> L.	57
Figure 16. Evolution de la viabilité de <i>St. thermophilus</i> lors du stockage.	58
Figure 17. Aspects macroscopiques des colonies de <i>St. thermophilus</i> lors du suivi de la viabilité.....	59
Figure 18. Aspect microscopique des cellules de <i>St. thermophilus</i> présent dans le yaourt brassé (x100).	60
Figure 19. Aspect microscopique des bactéries lactiques du yaourt (x100).....	61
Figure 20. Dispositif de titration pour la mesure de l'acidité titrable du yaourt brassé.	62
Figure 21. Evolution de l'acidité titrable du yaourt brassé lors du stockage.....	63
Figure 22. Evolution du pH du yaourt brassé lors du stockage.	64
Figure 23. Aspect du yaourt brassé préparé.....	65

Liste des abréviations

% : Pourcentage

µl : Micro litre

AFNOR: Association française de normalisation

B L: Bactéries Lactiques.

C° : Degré Celsius

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

CML: Concentration Minimale Létale

CNIEL: Centre National Interprofessionnel de l'Économie Laitière

CPG: Chromatographie en Phase Gazeuse

D° : Degré dornic

D₁: première dose

D₂: deuxième dose

D₃: troisième dose

DM: dilution mère

EMP: Embden-Meyerhof-Parnas.

EPS: Exopolysaccharides

EST: extrait sec total

FAO: Food and Agriculture Organization

FBA: Fructose Bisphosphate Aldolase.

FIL: Fédération Internationale Laitière

FTAM: flore totale aérobie mésophile

g: gramme

HE: Huile Essentielle

Ip: intra péritonéal

J1: premier jour

l : litre

Lb: *Lactobacillus*

M. communis: *Myrtus communis*

MC: Myrtucommulone

MG: matière grasse

ml : Millilitre

MRS: Man, Rogosa, Sharpe

PAM: plantes aromatiques et médicinales

PCA: Plate Count Agar

pH : potentiel hydrogène

Ppm: poids par masse

R^{mt} : Rendement

SM: Spectrométrie de Masse

sp. : Espèce non précisée

ssp. : Sous espèce

St : *Streptococcus*

T : Témoin

UFC /ml : Unité formant colonie par millilitre

UHT: Ultra Haute Température

YCB: yaourt commercial brassé

YPB: yaourt préparé brassé

Introduction

Les laits fermentés ont constitué une partie essentielle de l'alimentation humaine dans de nombreuses régions du monde depuis des temps immémoriaux. Environ 400 noms génériques sont appliqués aux produits laitiers traditionnels et industriels fabriqués à travers le monde. Ils sont principalement liés au type de lait utilisé, aux microorganismes impliqués et à la technologie appliquée.

Le yaourt peut être considéré comme une alimentation fonctionnelle (Kim, 2013) et des vertus santé ont été associées à sa consommation (Donovan et Shamir, 2014). Avec les progrès technologiques réalisés, le yaourt apparaît comme un produit laitier très digeste qui possède une grande valeur nutritionnelle et qui est apprécié pour son goût et sa texture. C'est un produit, consommé la plupart du temps comme dessert, très prisé par le monde, car il convient à toutes les tranches d'âge et même chez les sujets intolérants au lait.

Basé sur la qualité microbienne, la durée de conservation du yaourt est autour de trois semaines aux conditions de réfrigération. Ce dernier est toujours en danger de dégradation protéolytique par la protéolyse du lait qui peut se produire pendant l'entreposage au froid due à la croissance des bactéries psychrotrophes (FAO, 1995) et la production d'acide lactique.

La perception négative des consommateurs pour les additifs synthétiques a suscité un intérêt croissant pour trouver des alternatives naturelles. L'utilisation des substances d'origine naturelle comme bioconservateur est de plus en plus appréciée par les consommateurs comme alternative aux produits chimiques hautement dangereux pour la santé humaine (Vivek *et al.*, 2012).

Les plantes aromatiques et médicinales ont été traditionnellement utilisées comme arômes ainsi que pour prolonger la vie utile des aliments. Bien qu'elles soient peu utilisées commercialement comme conservateurs alimentaires, un grand nombre d'études ont été effectuées sur les huiles essentielles dans des matrices alimentaires afin qu'elles puissent être appliquées comme alternatives potentielles des conservateurs synthétiques.

L'utilisation des huiles essentielles dans ce sens a fait l'objet d'une centaine de travaux de recherche qui démontre leur efficacité au niveau des aliments aussi bien pour la prolongation de la durée de conservation que pour l'aromatisation. Dans ce dernier cas,

l'objectif étant de mettre sur le marché de nouveaux produits tout en diversifiant l'offre déjà existant. *Myrtus communis* L. est une plante aromatique et médicinale appartenant à la famille des Myrtaceae renfermant le plus grand nombre des plantes à propriétés aromatiques et médicinales. Leur activité antimicrobienne a été largement démontrée (Bouhdid *et al.*, 2006). L'intérêt de notre étude est de recherché à travers l'étude de l'effet de l'incorporation de l'huile essentielle de myrte sur la vie utile (le comportement des bactéries lactiques) et l'acidité du yaourt brassé au cours de son stockage.

Divers composants des huiles essentielles sont acceptés par la Commission européenne pour utilisation comme arômes dans les produits alimentaires (par exemple linalool, thymol, eugénol, carvone, cinnamaldéhyde, vanilline, carvacrol, citral et limonène) et font partie de la liste des ingrédients GRAS (Generally Recognized As Safe) de l'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments (Food and Drug Administration) (Hyldgaard *et al.*, 2012). L'effet conservateur de ces huiles ou de leurs composants a été testé sur divers produits alimentaires à savoir, les produits à base de viande, les poissons, les produits laitiers, légumes et fruits, les jus et sauces, etc. En général, il a été trouvé qu'une concentration plus grande en huile essentielle est nécessaire pour atteindre l'effet équivalent *in vitro* dans les aliments (Tiwari *et al.*, 2009 ; Hyldgaard *et al.*, 2012). En effet, la multi-composition et la structure physique d'un aliment peut limiter l'effet antibactérien des huiles essentielles (Rasooli, 2007). Les propriétés intrinsèques des aliments (protéines, graisses, amidon, teneur en eau, pH, sel et autres additives) mais aussi les déterminants extrinsèques (température, air, gaz, type d'emballage) peuvent influencer la sensibilité bactériale dans les aliments (Tassou *et al.*, 1995; Rasooli, 2007). Les huiles essentielles et leurs constituants possèdent un arôme intense même à de faibles concentrations ce qui peut influencer les propriétés organoleptiques des aliments dépassant le seuil acceptable par les consommateurs limitant ainsi leur utilisation (Tiwari *et al.*, 2009 ; Lv *et al.*, 2011). De ce fait, la sélection d'une huile adéquate devrait être basée non seulement sur son efficacité mais aussi sur sa compatibilité sensorielle et chimique avec l'aliment.

C'est dans ce cadre que s'inscrit la présente étude qui consiste en un essai de fabrication d'un yaourt brassé à base d'huile essentielle extraite d'une plante endémique connue pour ses vertus thérapeutiques qui est le myrte commun dont le nom taxonomique est *Myrtus communis* L. appelé communément Rayhan en Algérie.

L'objectif de cet essai est de voir la possibilité d'utiliser l'huile essentielle de myrte principalement comme conservateur ainsi comme aromatisant en déterminant son effet sur la stabilité des paramètres physicochimiques et organoleptiques du yaourt brassé préparé à l'échelle du laboratoire aussi sur la viabilité de ses ferments.

Pour la réalisation de cette expérience, différentes doses ont été testées et la mesure des paramètres physicochimiques (pH et acidité Dornic) et microbiologiques (dénombrement de la flore lactiques et la flore mésophile aérobie totale) a été effectuée à intervalles réguliers (une semaine) durant 21 jours de conservation à +4° C.

Partie 1 :
« Synthèse bibliographique »

Chapitre 1. Les bactéries lactiques et leurs applications dans la fabrication du yaourt

I. Les bactéries lactiques

1. Généralités sur les bactéries lactiques

1.1 Historique

Les bactéries sont de très anciens micro-organismes (Drider et Prevost, 2009), ils ont été utilisées pour la fermentation des aliments depuis plus de 4000 ans sans pour autant comprendre la base scientifique de leur utilisation, mais tout en essayant de produire des aliments de meilleure conservation et de meilleure qualité (Salloff-Coste, 1994). Ce n'est qu'à la fin du 19^{ème} siècle, époque des grandes découvertes de la microbiologie, que certains chercheurs ont isolé un streptocoque (Poulain, 1994). La production des cultures de bactéries et l'emploi de ferments se sont développés au début du 20^{ème} siècle (Drider et Prevost, 2009).

1.2 Définition

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme. Elles colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale. Le groupe des bactéries lactiques, a été défini pour la 1^{ère} fois par Orla –Jensen en 1919, réunit plusieurs genres de différentes morphologies (Voir figures 1a et 1b) ayant pour caractère commun leur capacité à fermenter le lactose en produisant de l'acide lactique (Novel, 1993). Ce sont des microorganismes à Gram positif, non sporulants, non mobiles, anaérobis mais aérotolérants et ne possédant pas de catalase. Toutes les bactéries lactiques possèdent un métabolisme fermentaire leur permettant, en utilisant des sucres fermentescibles, de produire principalement de l'acide lactique mais aussi d'autres acides organiques (acide acétique, acide formique...) (Raynaud, 2006).

2. Principales voies fermentaires des bactéries lactiques

Toute croissance nécessite la production d'énergie et les bactéries lactiques ne font pas exception à la règle. Hétérotrophes, elles tirent leur énergie de la fermentation de substrats carbonés. Les carbohydrates fermentés en acide lactique par les bactéries lactiques peuvent être des monosaccharides tels que des hexoses (glucose, galactose), des

pentoses (xylose, ribose, arabinose), hexitols et pentitols (mannitol, sorbitol, xylitol) ou des disaccarides (lactose, saccharose, cellobiose, tréhalose).

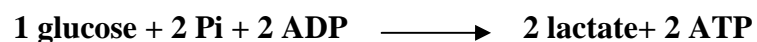
La fermentation des sucres s'effectue essentiellement en trois étapes (Atlan *et al*, 2008):

- Le transport du sucre à travers la membrane cellulaire ;
- Le catabolisme intracellulaire du sucre ;
- Formation et expulsion extracellulaire des métabolites terminaux.

Selon les genres ou espèces, les bactéries lactiques utilisent principalement l'une des deux voies majeures du métabolisme des sucres (figure 1). Il s'agit des voies : homofermentaire (Embden-Meyerhof-Parnas, EMP) et hétérofermentaire (voie des pentoses-phosphates) (Atlan *et al*, 2008).

2.1 Voie homofermentaire ou EMP

Les bactéries lactiques homofermentaires comprennent les espèces de lactocoques, pediocoques, ainsi que certains lactobacilles. Cette voie conduit dans des conditions optimales de croissance à la production de deux molécules de lactate et deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée. La fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA) est une enzyme clé indispensable au fonctionnement de la voie EMP (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).



2.2 Voie hétérofermentaire ou voie des pentoses phosphates

Les bactéries lactiques qui fermentent le glucose en produisant, en plus de l'acide lactique, de l'acétate, de l'éthanol et du CO₂ sont dites hétérofermentaires. Les principaux groupes de bactéries présentant ce type de métabolisme sont les leuconostoc et certains lactobacilles. Ces microorganismes sont dépourvus d'une FBA et le système de transport PTS « phosphotransferase system » (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).



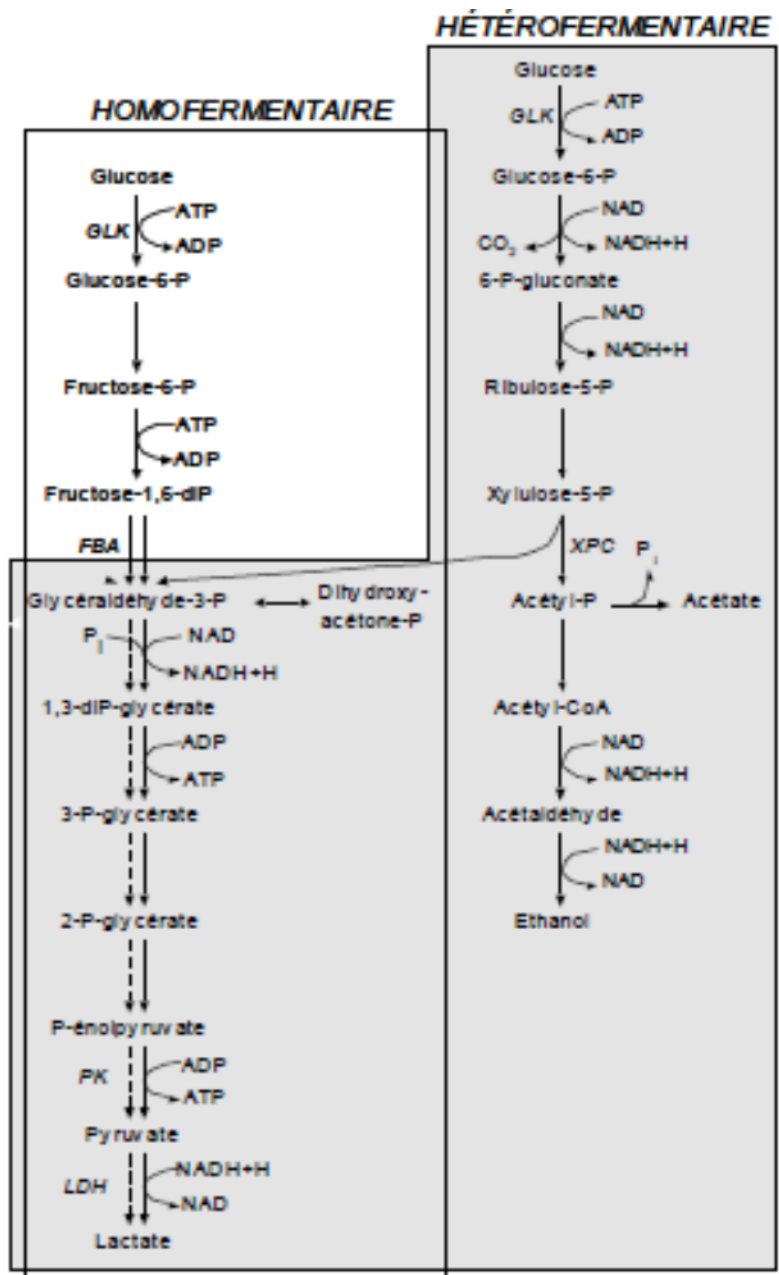


Figure 1. Voies homofermentaire et hétérofermentaire de la dégradation du glucose. Les principales enzymes sont indiquées en italique : *GLK* : glucokinase, *FBA* : fructose-1,6-bisphosphate aldolase, *XPC* : xylulose-5-phosphate phosphocétolase, *PK* : pyruvate kinase, *LDH* : lactate déshydrogénase (Raynaud, 2006).

3. Caractéristiques générales des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (B.L) sont des bactéries Gram positives, immobiles, asporulées, du point de vue enzymatique catalase et oxydase et nitrate réductase négatives, anaérobies ou aérotolérantes (Sutra *et al.*, 1998). Les bactéries lactiques ont des formes différentes : des cocci ou des bâtonnets (Bourgeois et Larpent, 1996). Elles ont des besoins complexes en facteurs de croissance : vitamine B, acide aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques. Certaines B.L ont été isolées de nombreux milieux naturels végétaux et animaux tels que le lait cru, l'environnement, les cavités buccales et vaginales... (Luquet, 1986). Elles se caractérisent par un métabolisme exclusivement fermentaire qui les conduit à produire à partir du glucose des quantités importantes d'acide lactique, accompagné dans certains cas d'autres métabolites (éthanol, CO₂, autres acides organiques) (Luquet, 1986).

3.1. Le genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* est toujours large et la classification est très mouvementée. Ce genre est généralement divisé en trois groupes : pyogène (la plus part des espèces pathogènes et hémolytiques), oral (tel que *St. salivarius*, *St. bovis*) et les autres streptocoques (Scheilfer, 1987).

La seule espèce de streptocoques qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* qui a été incluse dans le groupe des « autres streptocoques », mais ensuite transféré au groupe des streptocoques oraux à cause de leur degré d'homologie avec l'ADN de *Streptococcus salivarius* (Stiles et Holzapfel, 1997). *Streptococcus thermophilus* se différencie par son habitat (lait et produits laitiers) et son caractère non pathogène. La résistance à la température, la capacité de croître à 52°C et le nombre limité des hydrates de carbones permettent de distinguer les *St. thermophilus* de la plupart des autres streptocoques (Pilet *et al.*, 2005).

3.2. Le genre *Lactobacillus*

Lactobacillus est le genre principal de la famille des Lactobacillaceae, il contient de nombreuses espèces qui sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries ou qui sont rencontrées comme contaminants. Il s'agit de bacilles longs et fins (parfois incurvés) souvent groupés en chaînes, immobiles, asporulés, catalase négative, se développent à un optimum de température situé entre 30 et 40°C. Les

lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acides aminés, en vitamines, en acides gras, en nucléotides, en glucides et en minéraux (Leclerc *et al.*, 1994).

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par Orla-Jensen en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel (Guiraud et Rosec, 2004) :

- **Groupe I** « Thermobacterium » : comprend les lactobacilles homofermentaires thermophiles qui se développent à 45°C mais pas à 15°C. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation (lait, yaourt, fromage) sont *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*.
- **Groupe II** « Streptobacterium » : regroupe les lactobacilles homofermentaires mésophiles et peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat. Les espèces les plus fréquentes dans l'alimentation sont *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sake* et *Lb. plantarum*.
- **Groupe III** « Betabacterium » : ce sont des lactobacilles hétérofermentaires. Il comporte les espèces *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* et *Lb. sanfransisco*.

4. Les bactéries spécifiques du yaourt

Les deux bactéries associées dans la préparation du yaourt ont pour rôle principal d'abaisser le pH du lait au point isoélectrique de la caséine (pH 4,6) de façon à former un gel (ou coagulum). Outre le goût acidulé qu'elles donnent au gel, elles lui assurent une saveur caractéristique due à la production de composés aromatiques (acétaldéhyde principalement, cétone, acétoïne, diacétyl). Enfin, par la production de polysaccharides (glucanes), certaines souches ont une action dans la consistance du gel (FAO, 1995).

4.1. L'espèce *Lactobacillus bulgaricus*

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* est un bacille gram positif, immobile, asporulé et micro aérophile. Il est isolé sous forme de bâtonnets ou de chainettes (figure 2), il possède un métabolisme strictement homofermentaire et produit l'acide D-lactique à partir des hexoses par l'intermédiaire de la voie d'Embden Meyerhoff Parnas (EMP) et il est incapable de fermenter les pentoses (Axelsson, 1998). Il se développe bien à la température de 45 à 50° C en acidifiant fortement le lait jusqu'à 1,8 % (pH voisin de 4,5), voire 2,7 % d'acide lactique (pH 3,8 à 3,6) (FAO, 1995). *Lb. bulgaricus* est une bactérie thermophile, très exigeante en calcium et en magnésium et sa température optimale de

croissance est d'environ 42° C, elle est responsable de la production d'acétaldéhyde (Marty-Teyesset *et al.*, 2000).

4.2. L'espèce *Streptococcus thermophilus*

Streptococcus salivarius ssp.*thermophilus* est une cocci Gram positif, disposé en chaînes en longueurs variables ou par paires (figure 2), anaérobie facultatif et immobile. On le trouve dans les laits fermentés et les fromages (Roussel *et al.*, 1994). C'est une bactérie dépourvue de l'antigène D, sensible au bleu de méthylène (0,1%) et aux antibiotiques, incapable de métaboliser le galactose et se développe bien de 37 à 40 °C, mais croît encore à 50 °C. Thermorésistante, elle survit au chauffage à 65 °C pendant 30 minutes ou à 74 °C pendant 15 secondes et son métabolisme est de type homofermentaire (Vaillancourt *et al.*, 2008). *S. thermophilus* se différencie des autres espèces du même genre par son habitat (lait et produits laitiers), par son caractère non pathogène et ses propriétés probiotiques et technologiques (Iyer *et al.*, 2010).

En industrie agro-alimentaire, *S. thermophilus* est en deuxième position derrière *Lactococcus lactis* dans le classement des bactéries lactiques utilisées. Elle est la seule espèce du genre streptocoque utilisée dans la fabrication des produits laitiers fermentés (De Vuyst et Tsakalidou, 2008). Le rôle principal de cette bactérie dans la fabrication du yaourt est la fermentation du lactose du lait en acide lactique, mais elle est nettement moins acidifiante que le lactobacille, il produit généralement de 0,5 à 0,6 % d'acide lactique (pH voisin de 5,2) uniquement de configuration L qui est l'isomère préféré dans les produits alimentaires, dû à la présence de la L lactate déshydrogénase chez l'être humain (Panesar *et al.*, 2007). Certaines souches sont capables de supporter un pH de 4,3 à 3,8. En plus de son pouvoir acidifiant, elle est responsable de la texture des laits fermentés puisqu'elle augmente la viscosité du lait par production des exopolysaccharides (FAO, 1995).

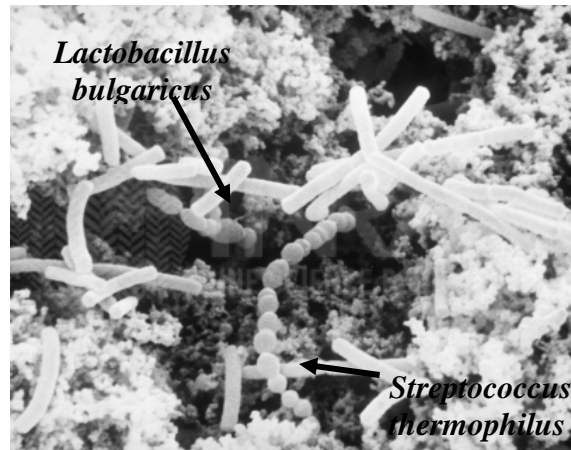


Figure 2. Aspect des levains thermophiles du yoghourt: lactobacilles et streptocoques dans le gel de caséine par microscopie électronique à balayage (image N°0668- 087 déposée par Rousseau Micheline sur <http://mediatheque.inra.fr/media/detail/160913/private>).

4.3. La proto-coopération entre *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus*

Qui dit association de cultures dit possibilité d'interactions : si elles sont bénéfiques pour l'une des souches ou les deux, on parlera alors de coopération entre les cultures. Si elles sont néfastes pour l'une des souches ou les deux, on parlera d'inhibition. Le terme de coopération regroupe donc les notions de commensalisme (interaction ayant un effet positif sur une des deux souches), de mutualisme et de protocoopération (interactions ayant un effet positif sur les deux souches, la première notion impliquant le caractère impérieux de l'interaction pour la survie des deux organismes, à l'inverse de la seconde). Le terme d'inhibition désigne, quant à lui, les notions d'amensalisme (interaction ayant un effet négatif sur une des deux souches) et de compétition, ces notions ont été définies par Frederickson (1977).

Le yaourt est un lait fermenté issu de la transformation du lait par les seules bactéries : *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*. L'utilisation combinée de *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* fait apparaître une interaction indirecte positive entre ces deux espèces (Pette et Lolkema, 1950). Cette interaction, appelée proto-coopération, est bénéfique mais pas indispensable au développement des deux espèces bactériennes. Elle se traduit par divers phénomènes :

- Accroissement des vitesses de croissance et des concentrations bactériennes finales ;
- Diminution du pH final du produit en culture mixte ;

- Augmentation des vitesses d'acidification par rapport aux vitesses observées en cultures pures) ;
- Stimulation de la production des composés d'arôme et notamment de l'acétaldéhyde ;
- Accroissement de l'activité protéolytique ;
- Amélioration de la stabilité physique du produit (réduction des problèmes de la synérèse) et de consistance ;
- Production accrue d'autres composés tels que les exopolysaccharides (Corrieu et Luquet, 2005).

Pour se développer, les bactéries ont besoin d'acides aminés et de peptides directement utilisables. Or, le lait n'en contient que de faibles quantités permettant seulement de démarrer leur croissance (Thevenard, 2011). *St. thermophilus* se développe plus rapidement au pH (6,6- 6,8) du lait et le rend légèrement acide, *Lb. bulgaricus* acidifie alors le lait d'avantage jusqu'à un pH d'environ 4,3 à 4,2 par l'attaque de la caséine qui libère les peptides permettant au streptocoque de poursuivre sa croissance.

De son côté, le streptocoque stimule le lactobacille par production d'acide formique, le dioxyde de carbone et l'acide pyruvique (figure 03) (Mahaut *et al*, 2000). Le streptocoque produit de l'acide lactique principalement sous la forme L(+), alors que le lactobacille donne surtout la forme D(-). En fin de fermentation, le tiers environ du lactose est transformé en acide lactique. Dans la fabrication du yaourt, l'utilisation du lactose se fait selon la voie suivante: une lactase hydrolyse le lactose en galactose et en glucose. Ce dernier est ensuite transformé en acide pyruvique puis en acide lactique pendant que le galactose s'accumule progressivement dans le lait sans être utilisé. Ainsi, dans un lait à 6,5% (en poids) de lactose, 100 g du yaourt obtenu contiennent environ, après 2 jours de conservation, 4 g de lactose, 0,05 g de glucose, 0,05 g d'oligosaccharide et 1,5 g de galactose (FAO, 1995).

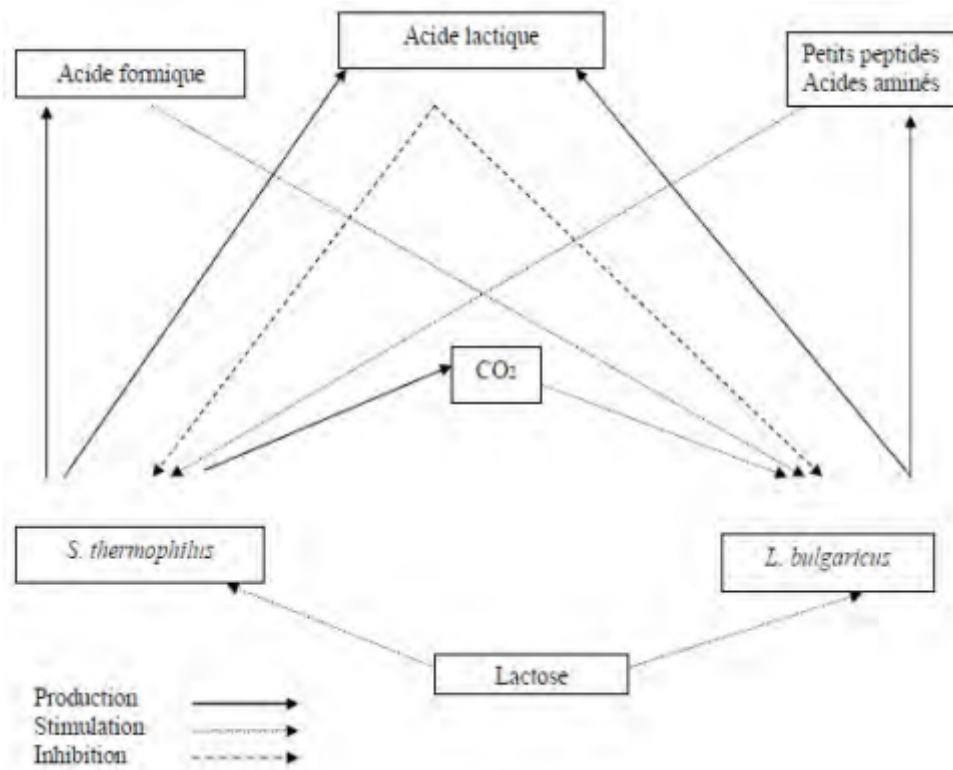


Figure 3. Proto-coopération entre *S.thermophilus* et *Lb.bulgaricus* (Mahaut *et al.*, 2000).

4.3.1. Les phénomènes de coopération

La coopération, qui se définit comme une interaction positive entre les souches, peut être mise en évidence de plusieurs manières.

4.3. 1. 1. Mise en évidence

a. Croissance des souches

Bien que la quantification rigoureuse d'une vitesse de croissance soit complexe, il s'agit du critère le plus commun pour démontrer ce type d'interactions. Moon et Reinbold (1976), dans leur étude sur un mélange de cultures pures de *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* ont prouvé l'existence d'une coopération en comparant les vitesses de croissance des souches, cultivées soit seules, soit en mélanges.

Ces auteurs ont montré que les taux de croissance sont, eux aussi, améliorés en culture mixte. En utilisant une culture mixte où le rapport des nombres de *L. bulgaricus* / *S. thermophilus* est de l'ordre de 2 dans l'inoculum, le taux de croissance de *S. thermophilus*

est plus du double de celui obtenu avec une culture pure de la même souche. Cette coopération se traduit, en fin de phase exponentielle de croissance, par une augmentation de 50 % du nombre de *S. thermophilus* en culture mixte par rapport aux dénombrements effectués en culture pure. C'est aussi en comparant les croissances que Pette et Lolkema (1950a) avaient mis en évidence la coopération: un simple comptage des bactéries indique que le nombre de cellules de *S. thermophilus* après 3 h d'incubation à 45 °C est plus élevé dans le cas d'une culture mixte avec *L. bulgaricus* que dans le cas d'une culture pure. Driessen *et al.* (1982) ont montré qu'il était possible de maintenir une population de *L. bulgaricus*, dans une fabrication continue de yoghourts, avec des taux de dilution deux fois plus élevés en culture mixte qu'en culture pure. Ceci confirme à l'évidence la coopération entre les deux souches du point de vue des taux de croissance.

b. Acidification

L'étude comparée de l'acidification est certainement le critère le plus couramment employé, dans le cas des bactéries lactiques. Pette et Lolkema (1950a) l'ont d'ailleurs utilisé conjointement avec la mesure de la croissance des souches, en estimant la production d'acide lactique avec de la soude décimale (tableau 1). Accolas *et al.* (1977) ont utilisé la même méthodologie pour étudier les propriétés acidifiantes des bactéries lactiques thermophiles. L'effet stimulant d'une souche sur une autre était apprécié en comparant la quantité d'acide produite par la culture mixte à la somme des quantités produites par les cultures pures (figure 4). Enfin, Hemme *et al.* (1981) ont mis en évidence l'effet stimulant d'extraits de lactobacilles thermophiles sur la production d'acide de *S. thermophilus*, en observant une diminution plus rapide du pH du milieu de culture après un temps donné d'incubation, lorsqu'ils ajoutaient ces extraits.

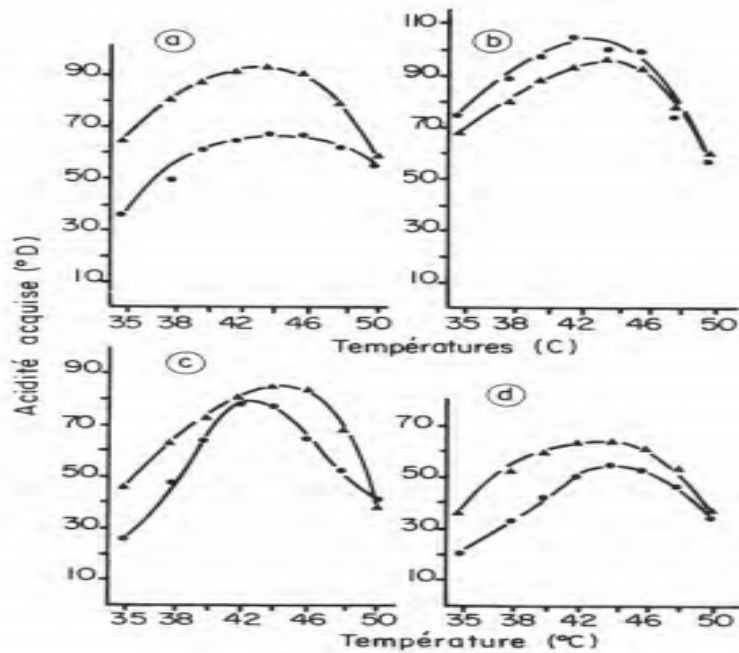


Figure 4. Production d'acide lactique de cultures mixtes de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus bulgaricus* et des cultures pures correspondantes (d'après Accolas *et al.*, 1977).

- a : ●—● Somme moyenne des acidités produites par les cultures pures de *L. bulgaricus* 369 et de *S. thermophilus* 160, 302, 368.
Average sum of acid production by single strains of *L. bulgaricus* 369 and *S. thermophilus* 160, 302 and 368.
▲—▲ Acidité moyenne des acidités produites par les cultures mixtes 369 + 160, 369 + 302, 369 + 368.
Average acidity produced by mixed strains 369 + 160, 369 + 302, and 369 + 368.
- b : ●—● Somme moyenne des acidités produites par les cultures pures de *L. bulgaricus* 384 et de *S. thermophilus* 385.
Average sum of acid production by single strains of *L. bulgaricus* 384 and *S. thermophilus* 385.
▲—▲ Acidité moyenne produite par la culture mixte 385 + 384.
Average acidity produced by mixed strains 385 + 384.
- c : ●—● Somme moyenne des acidités produites par les cultures pures de *L. helveticus* 303 et de *S. thermophilus* 160, 302, 368.
Average sum of acid production by single strains of *L. helveticus* 303 and *S. thermophilus* 160, 302 and 368.
▲—▲ Acidité moyenne produite par les cultures mixtes 303 + 160, 303 + 302, 303 + 368.
Average acidity produced by mixed strains 303 + 160, 303 + 362, and 303 + 368.
- d : ●—● Somme moyenne des acidités produites par les cultures pures de *L. lactis* 242 et de *S. thermophilus* 160, 302, 368.
Average sum of acid production by single strains of *L. lactis* 242 and *S. thermophilus* 160, 302 and 368.
▲—▲ Acidité moyenne produite par les cultures mixtes 242 + 160, 242 + 302, 242 + 368.
Average acidity produced by mixed strains 242 + 160, 242 + 302, and 242 + 368.

Tableau 1. Récapitulatif des principales études effectuées sur les facteurs stimulant *Lactobacillus bulgaricus* ou *Streptococcus thermophilus* pour la production d'acide lactique.

Référence	Facteur de stimulation de <i>L. bulgaricus</i>	Facteur de stimulation de <i>S. thermophilus</i>	Méthode de mesures
Galesloot <i>et al.</i> (1968) Veringa <i>et al.</i> (1968)	Formiate		Vitesse moyenne d'acidification
Accolas <i>et al.</i> (1971)	Surnageant de culture de streptocoques Formiate Adénine	Surnageant de culture de lactobacilles	
Higashio <i>et al.</i> (1978)	Formiate et pyruvate	Val, Glyc, His, Glu, Leu	
Driessen <i>et al.</i> (1982)	Formiate CO ₂ HCO ₃		Taux de croissance (estimé en culture continue)
Pette et Lolkem, (1950)		Acides aminés (valine)	Numérations et activité acidifiante
Bautista <i>et al.</i> (1966)		Activité protéolytique	
Desmazeaud et Hermier (1973)		Peptides exogènes	
Moon et Reinbül (1976)		Filtrats de cultures de <i>L. bulgaricus</i>	
Shankaret Davies (1978)		Protéinases de <i>L. lactobacillus</i>	
Bracquart <i>et al.</i> (1978)		Glu, Met, Tyr, Cys, Phe, His, Arg	Vitesse d'acidification
Bracquart et Lorient (1979)		Glu-His, His-Glu, Met-His-Glu, Glu-His-Met	
Radke-Mitchel et Sandine (1984)		Complémentarité entre protéinases de <i>Lactobacillus</i> et aminopeptidase de <i>Streptococcus</i>	

c. Production de métabolites particuliers

Le phénomène de coopération entre les bactéries lactiques se répercute également sur la production de métabolites dits secondaires. Une coopération entre souches peut être bénéfique à la production de composés d'arôme. Hamdan *et al.* (1971) ont montré que *L. bulgaricus* produisait plus d'acétaldéhyde que *S. thermophilus* mais que la somme des productions d'acétaldéhyde en culture pure restait inférieure à la production correspondante de la culture mixte. D'autres critères peuvent être employés pour montrer cette coopération, comme la mesure du temps de coagulation du lait, qui est plus court dans le cas d'une culture mixte que dans le cas de cultures pures (Koroleva et Kondratenko, 1982), ou comme l'évolution de la viscosité du lait (Galesloot et Hassing, 1973).

d. Coopération par production de nutriments azotés

Le lait est un milieu de culture relativement pauvre en composés azotés de bas poids moléculaire (acides aminés et peptides). Selon Thomas et Mills (1981) la plupart des acides aminés libres trouvés dans le lait sont en concentration trop faible pour obtenir des densités cellulaires importantes. Par exemple, il n'y aurait respectivement que 34 et 27 % des concentrations de leucine et d'arginine requises pour une croissance maximale de la plupart des streptocoques lactiques. Cette carence en acides aminés libres a été également soulignée par Marshall et Law (1984).

Il est maintenant bien connu que l'apport exogène d'acides aminés (Pette et Lolkema, 1950b ; Bracquart et Lorient, 1977 ; Shankar et Davies, 1977a ; Bracquart *et al.* 1978) ou de peptides (Desmazeaud et Devoyod, 1970 ; Desmazeaud et Hermier, 1972 ; Bracquart et Lorient, 1979) a un effet stimulant sur la production d'acide lactique des streptocoques thermophiles. D'autre part, l'hydrolyse et l'utilisation des protéines du lait comme source d'azote ont été clairement démontrées. Des protéines du lait marquées au ¹⁴C sont utilisées et leur radioactivité est suivie dans les protéines bactériennes lors de la croissance de *S. cremoris* dans le lait. L'activité spécifique des protéines cellulaires augmente, indiquant que les protéines du lait deviennent une source d'azote de plus en plus importante avec l'accroissement de la densité cellulaire (Thomas et Mills, 1981).

On peut s'attendre à ce que la coopération entre souches intervienne dans le cas des cultures mixtes, du fait des fortes variations de l'activité protéolytique d'une espèce à une autre, ou même, d'une souche à une autre (Law et Kolstad, 1983). Par exemple, Shankar et

Davies (1977b) ont démontré le rôle joué par *L. bulgaricus* dans la stimulation de *S. thermophilus*, en utilisant des filtrats de culture du lactobacille ayant poussé sur du lait. Les fractions peptidiques, obtenues à partir de ces filtrats par chromatographie échangeuse d'ions, par filtration sur gel et par chromatographie sur papier, étaient fortement stimulantes pour *S. thermophilus*, sans toutefois contenir des acides aminés.

Hickey *et al.* (1983), Miller et Kandler (1967) et Radke-Mitchell et Sandine (1984) ont étudié la faculté des lactobacilles, de produire dans le milieu de culture, des acides aminés à partir de caséinate de sodium et ils ont constaté que tous les lactobacilles testés possédaient une aminopeptidase générale. Les streptocoques thermophiles n'ayant pas d'enzyme protéolytique extracellulaire, cela explique la stimulation de croissance observée par apport d'acides aminés ou de peptides (Desmazeaud, 1983a). Cette production d'acides aminés par les lactobacilles a été également constatée par Radke-Mitchell et Sandine (1984) dans le yoghourt où les acides aminés libres représentent 1 % du total des protéines, soit une augmentation des taux allant de 6 à 24 (mg/100 ml) Comme, de son côté, *S. thermophilus* est doté de peptide-hydrolases intracellulaires de spécificité générale (Desmazeaud, 1983b), il peut utiliser les peptides exogènes comme source d'acides aminés.

e. Coopération par modification des conditions physiologiques du milieu

Étant donné que le lait n'est pas un milieu de culture optimal pour les bactéries lactiques, il est évident que des modifications de conditions physiologiques peuvent avoir un rôle bénéfique pour les souches. Nous ne reviendrons pas sur la modification de la teneur en acides aminés ou en peptides du lait, mais nous nous attacherons aux conséquences de la modification du pH ou à la possibilité d'élimination des facteurs inhibiteurs.

➤ Influence de la modification du pH

En étudiant l'influence de l'âge des cultures de lactobacilles sur la production d'enzymes protéolytiques, Ezzat *et al.* (1982) ont montré que l'activité spécifique d'exopeptidases des trois espèces étudiées (*L. bulgaricus*, *L. helveticus* et *L. lactis*) augmentait pendant la phase exponentielle de croissance à 40 °C. L'augmentation de l'activité peptidasique, facteur de coopération comme nous venons de le voir pourrait être en relation avec la diminution du pH du milieu. Cogan *et al.* (1981) ont mis en évidence le rôle du pH sur l'utilisation du citrate par les *Leuconostoc*, bactéries habituellement

présentes dans les levains mésophiles producteurs d'arôme. Parallèlement, ces auteurs ont étudié le rôle du pH sur l'activité des enzymes productrices de composés d'arômes de certains produits laitiers: ces enzymes ont une activité maximale dans une zone de pH voisine de 5,5. Cette augmentation d'activité explique l'utilisation avantageuse de ces bactéries en culture mixte avec *S. cremoris* et/ou *S. lactis* (Marshall et Law, 1984).

Ces deux études montrent que la diminution de pH, plus rapide et plus accentuée lorsque l'on a affaire à une culture mixte, a certainement un rôle bénéfique sur au moins une des deux souches; elle pourrait intervenir en augmentant la force proton-motrice des bactéries donc en augmentant l'énergie métabolisable par l'intermédiaire du gradient de potentiel chimique du lactate (Konings et Otto, 1983). L'importance de ce phénomène sera développée plus loin.

➤ **Élimination de composés inhibiteurs**

Les bactéries lactiques sont des organismes microaérophiles, voire strictement anaérobies pour certaines. Dans tous les cas, tout facteur diminuant la quantité d'O₂ dissous dans le milieu de culture stimule leur croissance et favorise la production d'acide lactique. Shekar et Bhat (1983) ont montré que les bactéries lactiques induisaient, à des degrés divers, une diminution du taux d'oxygène dans le lait. Leur incubation était en effet suivie d'une diminution de la concentration en oxygène et en radicaux sulfhydryles libres. Comme un échantillon témoin, ramené à la même acidité par addition d'acide lactique, ne montre pas ce phénomène, les auteurs en ont conclu que l'oxydation des groupes sulfhydryles libres par l'oxygène est catalysée par le métabolisme des bactéries lactiques. Les différences entre les cinétiques de diminution de l'oxygène d'une part, et la sensibilité des souches au facteur toxique oxygène d'autre part, peuvent être à l'origine d'une coopération entre les souches. Kanbe et Uchida(1985) ont confirmé ce phénomène en montrant que des cellules de *Pediococcus halophilus* consommaient de l'oxygène, à des vitesses spécifiques variant de 5,52 à 6,59 nmol/min.mg de poids sec, avec du L-lactate comme substrat.

Nous verrons dans la seconde partie que le peroxyde d'hydrogène peut aussi inhiber les bactéries lactiques. Reiter. B (1978) a montré que l'addition d'agents réducteurs comme la cystéine réduisait le peroxyde d'hydrogène et annulait donc l'inhibition. L'activité protéolytique des lactobacilles peut donc interférer avec ce composé (on a vu qu'il y avait augmentation du taux d'acides aminés libres sous leur action) et, ce faisant, lever

l'inhibition. L'activité inhibitrice des acides gras sur la croissance des streptocoques, des lactobacilles et des *Leuconostoc* a été constatée à plusieurs reprises. Poznanski *et al.* (1968) ont montré que l'acide oléique, qui inhibe la croissance et la production d'acide de *L. helveticus*, est, par contre, utilisé en grandes quantités par *S. lactis*. Il y a donc encore la possibilité de coopération.

f. Autres phénomènes pouvant permettre une coopération

A la suite des travaux d'Auclair et Portmann (1958), consacrés aux effets stimulants du chauffage du lait sur la croissance ultérieure de souches de bactéries lactiques, Galesloot *et al.* (1968) ont étudié l'influence des conditions de culture sur l'acidité produite par un mélange de souches de *L. bulgaricus* et *S. thermophilus*. Une souche de *S. thermophilus* est incubée dans du lait écrémé chauffé 10 mn à 90 °C, sous atmosphère d'azote. A différents stades de la croissance, le streptocoque est éliminé par chauffage à 80 °C. *L. bulgaricus* est alors incubé, et l'acidité produite est mesurée par titration à la soude 0,1 N. L'activité acidifiante, que ces auteurs ont obtenue, est alors comparable à celle qui est observée en ajoutant de l'acide formique au mélange de souches cultivées sous air. Le phénomène a été confirmé par d'autres chercheurs, l'acide formique est stimulant quand il est présent dans le milieu de culture à des taux d'environ 32 mg/l de culture (Accolas *et al.*, 1971 ; Shankar et Davies, 1978).

Higashio *et al.* (1978) mettent en évidence un effet synergique des acides formique et pyruvique sur la stimulation. Accolas *et al.* (1971) soulignent l'hypothèse selon laquelle l'acide formique serait impliqué dans la synthèse de l'adénine, composé stimulant la croissance (Auclair et Portmann, 1955). Il a été aussi montré, en séparant les acides gras volatils d'une culture de streptocoques par chromatographie, et en testant l'activité stimulante des fractions, que l'acide formique se trouvait dans le milieu de culture à des taux d'environ 32 mg/l de culture (Galesloot *et al.*, 1968). Veringa *et al.* (1968) sont ceux qui ont été le plus loin dans cette recherche. S'ils montrent bien la présence d'acide formique dans les échantillons prélevés en fin de culture, ceux-ci ne donnent pas la quantité initiale d'acide formique dans le lait qu'ils ont utilisé (chauffé à 90°C pendant 10 mn). D'autre part, aucune cinétique de production d'acide formique par *S. thermophilus* n'a jamais été publiée. On peut donc se demander si *S. thermophilus* stimule *L. bulgaricus* par la production de ce composé !

Driessen *et al.* (1982), en étudiant l'effet du taux de dilution sur *L. bulgaricus* cultivé en continu à pH constant, ont montré que l'augmentation de la concentration en CO₂ dans le milieu stimulait la culture. Concomitamment, ces auteurs ont mis en évidence la production de CO₂ par *S. thermophilus* et ont ainsi prouvé l'existence d'un autre facteur de coopération. Reiter et Oram (1962) avaient déjà remarqué cet effet du CO₂ lors de leur étude sur les besoins en vitamines de souches pures de streptocoques, et ils l'avaient imputé à l'intervention du CO₂ dans la synthèse de l'acide aspartique. Tinson *et al.* (1982) interprètent la production de CO₂ par *S. thermophilus* comme la conséquence de la décarboxylation, par une uréase, de l'urée présente dans le lait. Bien que Farrow et Collins (1984) ne mentionnent pas l'existence d'une uréase chez *S. thermophilus* comme caractère taxonomique représentatif de l'espèce de *S. thermophilus*.

4.4. Aptitudes technologiques des bactéries du yaourt

4.4. 1. Aptitude acidifiante

La fonction acidifiante constitue la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries alimentaires. Elle se manifeste par la production de l'acide lactique à partir de la fermentation des hydrates de carbone au cours de la croissance bactérienne (Mäyrä- Mäkinen et Bigret, 2004 ; Monnet *et al.*, 2008). Selon Béal *et al.* (2008), les conséquences, d'ordre physico-chimique et microbiologique, peuvent se résumer ainsi par :

- Accumulation d'acide lactique participant à la saveur des aliments fermentés ;
- Abaissement progressif du pH des milieux de culture et des matrices alimentaires ;
- Limitation des risques de développement des flores pathogène et d'altération dans les produits finaux ;
- Déstabilisation des micelles de caséines, coagulation des laits et participation à la synérèse.

Pour un ferment donné, il s'agit de permettre une vitesse d'acidification élevée et/ou d'atteindre un niveau d'acidité finale prédéfinie. Le niveau d'acidité dépend des spécifications du produit, lesquelles vont conditionner le choix des souches (Monnet *et al.*, 2008).

4.4. 2. Aptitude protéolytique

La croissance jusqu'à des densités cellulaires permettant aux bactéries lactiques d'assurer les fonctions de fermentation repose sur un système protéolytique capable de satisfaire tous les besoins en acides aminés en hydrolysant les protéines. Les bactéries lactiques démontrent des potentialités différentes, liées à leur équipement enzymatique, pour l'utilisation de la fraction azotée. Les lactobacilles présentent généralement une activité protéolytique plus prononcée que les lactocoques (Donkor *et al.*, 2007 ; Monnet *et al.*, 2008 ; Roudj *et al.*, 2009).

4.4. 3. Aptitude lipolytique

Les propriétés lipolytiques sont généralement faibles chez les bactéries lactiques, les lactocoques sont considérés comme plus lipolytiques que *Streptococcus thermophilus* et les lactobacilles. Elles peuvent cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères (Béal *et al.*, 2008). D'une manière générale on distingue les estérases qui hydrolysent de façon préférentielle les esters formés avec les acides gras à chaîne courte (C2-C8) et les lipases qui sont actives sur des substrats émulsifiés contenant des acides gras à chaîne longue (>C8), ces enzymes sont impliquées dans l'hydrolyse de mono, di, et triglycérides (Béal *et al.*, 2008 ; Serhan *et al.*, 2009).

4.4. 4. Aptitude aromatisante

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques (tels que : l'acétaldéhyde, le diacétyl, l'acétoïne et 2,3-butanediol, l'éthanol, l'acétate, le formiate, ...etc.) principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses. Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits fermentés, des fromages frais, crèmes et beurre, dont l'arôme principal est lié à cette activité microbienne (Bourgeois et Larpent, 1996 ; Gerrit *et al.*, 2005 ; Cholet, 2006).

4.4. 5. Aptitude texturante

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des exopolysaccharides (EPS) joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés. Les *Lb. delbrueckii ssp.bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* produisant des EPS sont utilisés dans la fabrication des yaourts, ceci afin d'améliorer la texture, éviter la synérèse et augmenter la viscosité des produits finis. L'utilisation des EPS produits par les souches *Lc.*

lactis ssp. *cremoris* est très prometteuse pour la structure et la viscosité des produits laitiers fermentés (Leroy et De Vuyst, 2004 ; Ho *et al.*, 2007).

4.4. 6. Activité antimicrobienne

Les bactéries lactiques produisent une variété de composés antimicrobiens qui sont utilisés dans la fermentation et la bioconservation des aliments (Labioui *et al.*, 2005). Les acides organiques, comme l'acide lactique, l'acide acétique ou l'acide propionique, élaborés lors de la fermentation des glucides, peuvent inhiber des levures, des moisissures et des bactéries. Le peroxyde d'hydrogène produit par les bactéries lactiques s'accumule dans l'environnement et peut inhiber certains microorganismes. Les bactéries lactiques hétérofermentaires synthétisent du dioxyde de carbone comme métabolite secondaire. Son accumulation dans le milieu extérieur crée une anaérobiose qui s'avère toxique pour certains microorganismes aérobies présents dans l'aliment. Le diacétyle peut inhiber la croissance des bactéries à Gram négatif, des levures et moisissures (Alakomi *et al.*, 2000 ; Ammor *et al.*, 2006).

Les bactériocines produites par les bactéries lactiques sont des substances antimicrobiennes de poids moléculaire variable. Elles ont une activité inhibitrice dirigée contre les bactéries proches de la souche productrice et leur spectre d'action est généralement étroit. Les plus connues sont : la nisine, la diplococcine, l'acidophiline et la bulgaricane (Ogunbanwo *et al.*, 2003 ; Dortu et Thonart, 2009). La plupart des bactériocines produites par les bactéries lactiques partagent le même mode d'action, basé sur la formation de pores dans la membrane de la bactérie cible (De Vuyst et Leroy, 2007 ; Kumari *et al.*, 2009).

5. Applications industrielles des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques assez diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements. Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle (Streit *et al.*, 2007). Dans l'industrie alimentaire, ces microorganismes permettent la conversion d'une grande variété de matières premières, conduisant ainsi à de nombreux produits comme les laits fermentés (yaourt) (Axelsson, 2004 ; Streit *et al.*, 2007). Les bactéries lactiques sont également utilisées dans l'industrie chimique (production d'acide lactique), dans le domaine médical (notamment pour le traitement de dysfonctionnements intestinaux) et dans l'industrie des

additifs alimentaires (production d'exopolysaccharides). Elles sont aussi utilisées pour la production de bactériocines et des protéines thérapeutiques (Rodriguez *et al.*, 2003).

Le rôle des levains lactiques est double : d'une part, ils sont responsables de l'acidification du lait, du fait de la production d'acide lactique; d'autre part, leur métabolisme est à l'origine des modifications de texture et de flaveur permettant d'aboutir à la qualité organoleptique du produit final (Cogan, 1980). Considérons l'exemple du yoghourt (Accolas *et al.*, 1980) : la faible valeur du pH final empêche le développement de germes indésirables (producteurs de gaz, putréfiants), et évite le développement de germes pathogènes.

De plus, le métabolisme des souches est, en grande partie, responsable de la qualité organoleptique du produit final. Dans le cas des fromages à pâte cuite (Accolas *et al.*, 1980), la protéolyse joue un rôle fondamental en modifiant les propriétés rhéologiques, et en provoquant l'apparition de composés d'arôme (ou de précurseurs) ; l'acidification permet, quant à elle, d'éliminer l'eau du caillé dans de bonnes conditions (phénomène de synérèse). L'étude des propriétés organoleptiques du beurre et des fromages à pâte molle a permis de mettre en évidence la dualité des levains mésophiles (Cogan, 1980). En effet, les cultures qui déterminaient un bon développement d'arôme contenaient en fait un mélange de deux types de bactéries lactiques, l'un produisant une plus grande quantité d'acide lactique et l'autre produisant des quantités d'arômes plus élevés.

II. Le yaourt et sa technologie

1. Le lait fermenté

On appelle lait fermenté un produit laitier obtenu par la fermentation du lait, lequel peut avoir été fabriqué à base de produits obtenus à partir de lait avec ou sans modification de composition, par l'action de micro-organismes appropriés et résultant dans la réduction du pH avec ou sans coagulation (précipitation isoélectrique). Ces levains (micro-organismes) doivent être viables, actifs et abondants dans le produit à la date de durabilité minimale (Codex Alimentarius, 1975).

2. Définition et données sur le yaourt

Selon la définition établie par la FAO (Food Agricultural Organisation) et l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) en 1977, le yaourt est un lait coagulé obtenu par la fermentation lactique due à deux ferments spécifiquesensemencés simultanément :

Streptococcus thermophilus et *Lactobacillus bulgaricus* qui sont contenus naturellement dans le lait, à l'exclusion de toute autre bactérie. Ces bactéries doivent se retrouver vivantes à la concentration de 10^7 /g de produit. Elles sont aussi thermophiles et dégradent le lactose en acide lactique à partir de 45°C dont la teneur doit être au moins 0,7 % lors de sa vente (Vierling, 2008).

Le Codex Alimentarius, norme n° A- 11 (a) (1975) définit ainsi le yaourt: " Le yaourt est un produit laitier coagulé obtenu par fermentation lactique grâce à l'action de *Lactobacillus bulgaricus* et de *Streptococcus thermophilus* à partir du lait frais ainsi que du lait pasteurisé (ou concentré, partiellement écrémé, enrichi en extrait sec) avec ou sans addition de (lait en poudre, poudre de lait écrémé, etc.). Les micro-organismes du produit final doivent être viables et abondants ".

La législation de nombreux pays exige que les bactéries du yaourt soient vivantes dans le produit mis en vente. D'autres pays admettent qu'à la suite d'un traitement thermique destiné à améliorer la durée de conservation, le produit ne contient plus de bactéries vivantes. Cette pratique n'est pas recommandable, car elle modifie les propriétés du yaourt (FAO, 1995).

3. Les critères de qualité du yaourt pris en compte par le Codex

3.1 Dénomination de produit

Elle varie selon les langues, mais les termes les plus utilisés sont «yoghurt » ou «yoghurt » ou « yaourt »

3.2 Type de produit

Ils sont définis souvent en fonction de leur teneur en matière grasse ou de l'adjonction éventuelle d'ingrédients (yoghourt partiellement écrémé, yoghurt écrémé, yoghurt sucré et yoghurt nature).

3.3 Type de ferment utilisé

Selon la FIL (Fédération Internationale Laitière) et de nombreux pays, la dénomination « yaourt » nécessite l'utilisation obligatoire et exclusive des deux ferments caractéristiques *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Luquet et Corrieu, 2005).

3.4 La quantité de ferment contenue dans le produit finis

La FIL fixe la quantité de ferment vivants, égale à 10^7 bactéries/g rapportés à la partie lactée jusqu'à la date limite de consommation.

3.5 La viabilité de la flore lactique

Flore viable pendant toute la durée de vie (jusqu'à la date limite de consommation).

3.6 Ingrédients laitiers

Lait pasteurisé, congelé, écrémé, concentré, en poudre, crème et caséines etc.

3.7 Ingrédients non laitiers

Une multitude d'ingrédients peut être utilisée par exemple de fruits sous différentes formes (purée, jus, pulpe, sirop etc). La quantité des ingrédients non laitiers est fixée par le Codex Alimentarius, la FIL et la plupart des pays à moins de 30% en poids du produit fini.

3.8 pH

La FIL préconise une teneur de 0,7% d'acide lactique. Cette valeur est respectée dans certains pays avec une variabilité de 0,6 à 15%. Certaines normes imposent un pH inférieur à 4,5 ou 4,6 (Luquet et Corrieu, 2005).

3.9 Taux de matière grasse

Il doit être minimum inférieur à 3% dans le cas des yaourts (nature, sucré ou aromatisé). Compris entre 0.5 et 3% dans le cas des yaourts partiellement écrémés et 0.5% pour les yaourts écrémés.

3.10 Teneur en protéines

Elle est égale à 2,8% dans le produit fini. En fonction de la technologie de fabrication, les yaourts sont divisés en deux groupes :

- a. Yaourts fermes :** dont la fermentation a lieu en pots, ce sont généralement des yaourts nature ou aromatisés
- b. Yaourts brassés :** dont la fermentation a lieu en cuves avant le conditionnement, ce sont généralement des yaourts brassés nature ou aux fruits (Luquet et Corrieu, 2005).

Les yaourts et les produits fermentés frais identifiés comme aliments bénéfiques pour la santé, sont aujourd'hui des produits de grande consommation. Ainsi, selon une enquête du Centre National Interprofessionnel de l'Économie Laitière (CNIEL), la

production de yaourts et d'autres laits fermentés ne cesse de croître et est parvenue à 1 435 993 tonnes en 2002 (Paci Kora, 2004).

4. Technologie de fabrication du yaourt

Selon la Fédération internationale laitière, le yaourt est issu d'un mode de fabrication bien précis. Ce n'est en effet que sous certaines conditions qu'un lait fermenté peut porter l'appellation de " yaourt ou yoghourt ".

Le diagramme de production diffère selon le type de produit : yaourt ferme dont la fermentation se fait après conditionnement en pots, ou brassé dont la fermentation se fait en cuve. Le coagulum obtenu dans ce dernier cas est dilacéré et brassé pour être rendu plus au moins visqueux puis conditionné en pots. Le diagramme général de production (figure 5) présente les étapes de fabrication qui seront décrites postérieurement :

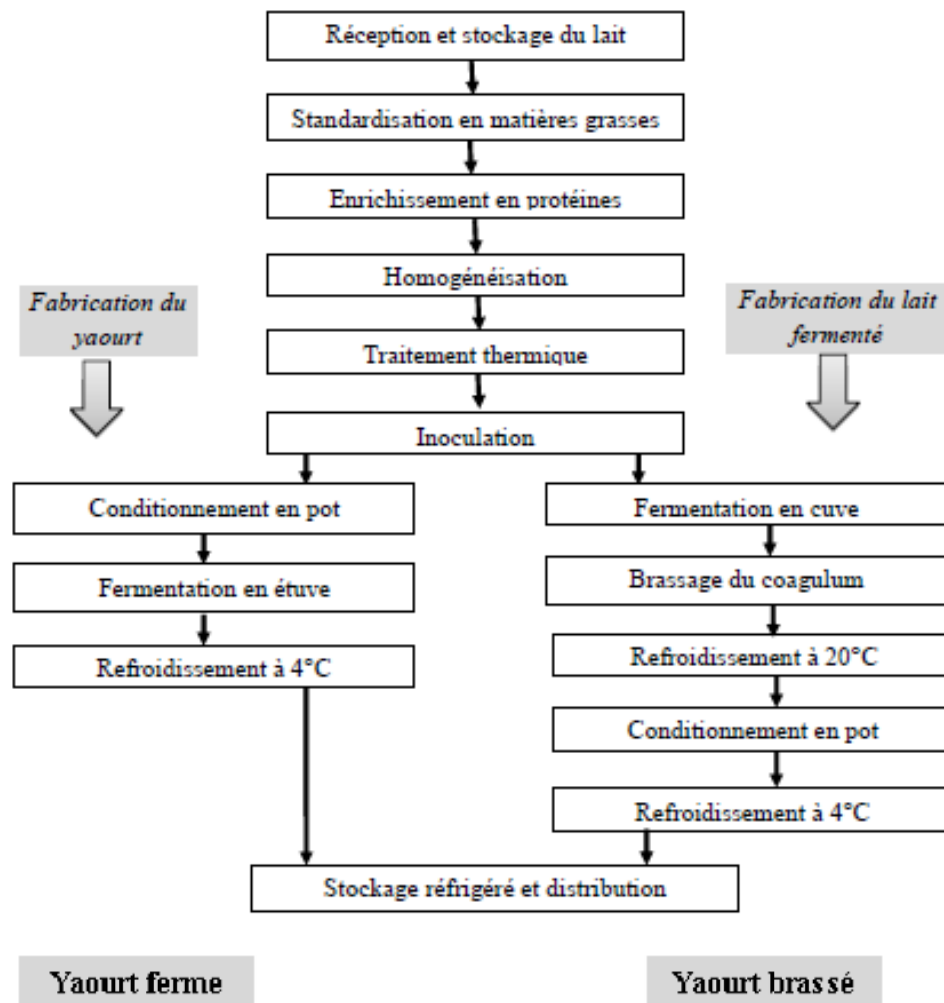


Figure 5. Diagramme de fabrication du yaourt (à gauche yaourt ferme et à droite yaourt brassé) d'après Béal et Sodini (2012).

4.1. Préparation du lait

La matière première peut être soit du lait frais, soit du lait recombinaé (à partir de lait en poudre maigre et de matière grasse laitière anhydre), soit du lait reconstitué (à partir de lait en poudre maigre), ou encore un mélange. Dans tous les cas, elle doit être de bonne qualité microbiologique, exempte d'antibiotiques ou d'autres inhibiteurs et parfaitement homogénéisée (FAO, 1995).

4.2. Standardisation du mélange

La consistance et la viscosité du yaourt sont pour une grande partie sous la dépendance de la matière sèche du lait. En effet, tous les nutriments jouent un rôle sur la qualité finale du yaourt (FAO, 1995). Les protéines, de par leur coagulation et leur capacité de liaison avec l'eau, agissent sur la texture, particulièrement sur la viscosité, la consistance, l'élasticité et la fermeté. La graisse confère de l'onctuosité et la sensation de douceur à la bouche, masque l'acidité et améliore la saveur (Lamontagne, 2002). Le lactose est le composé utilisé pour l'acidification et a un faible pouvoir sucrant, soit quatre fois plus faible que celui du sucre de table. Les minéraux, comme des bouillons, travaillent à la stabilisation du gel et les vitamines sont requises pour la croissance bactérienne (Atlan *et al.*, 2008).

La standardisation du mélange laitier permet non seulement de pallier aux variations de composition du lait mais aussi, à obtenir la composition désirée. Cette standardisation peut s'obtenir par l'ajout de concentrés et d'isolats de protéines sériques, de poudre de lait écrémé ou entier (généralement, l'addition de lait en poudre est la méthode employée pour renforcer l'extrait sec du lait de façon à porter l'extrait sec du produit à 120-150 g par litre), de lactose et de la crème en fonction de la teneur désirée en protéines et matière grasse (Tamime et Robinson, 1999).

Selon le Code des principes FAO/OMS, la teneur minimale en matière sèche laitière non grasse est de 8,2 % (en poids) quelle que soit la teneur en matière grasse (norme n° A- 11 (a), 1975) (FAO, 1995). La teneur en matière grasse du yaourt est variable. Généralement, elle est ajustée de sorte que le produit entre dans l'une des catégories ci-après :

- a. **Yaourt entier** : au minimum 3% (en poids) de matière grasse ; en pratique de 3 à 4,5 %;

- b. Yaourt partiellement écrémé :** moins de 3% (en poids) de matière grasse ; en pratique: de 1 à 2 %;
- c. Yaourt écrémé :** au minimum 0,5 % (en poids) de matière grasse; en pratique de 0,05 à 0,1 %.

4.3. Homogénéisation

L'homogénéisation du lait a plusieurs objectifs : elle améliore la fermeté des gels obtenues après fermentation, augmente leur capacité de rétention d'eau et réduit la synérèse , par ailleurs elle prévient le crémage au cours des opérations « statiques » de la fabrication du yaourt, en particulier lors de la période d'incubation en pots ou dans les cuves de fermentation, cela est due au fractionnement de la taille des globules gras de 4-5 μm à 1 μm par cisaillement (Amiot, 2002). En plus de conférer une couleur plus blanchâtre au mélange laitier, cette diminution de diamètre facilite l'insertion des globules gras dans les pores du réseau caséique du yaourt. Cette étape permet également de mélanger de façon homogène les divers ingrédients laitiers ajoutés lors de l'étape de la standardisation. Une autre des conséquences de l'homogénéisation est la formation de nouvelles gouttelettes de globules de gras entourées par des caséines et des protéines sériques. La résultante est une augmentation du caractère hydrophile des globules de gras (Schorsch, 2001).

4.4. Traitement thermique

Le lait enrichi, éventuellement sucré, subit un traitement thermique. Le barème de traitement thermique le plus couramment utilisé est de 90- 95°C pendant 3 à 5 minutes (Mahaut, 2000). Cependant, une température élevée pendant un bref temps (100°C à 130°C pour 4 à 16 S) ou bien une ultra haute température (UHT) (140°C pour 4 à 16 s) sont parfois utilisés (Sodini *et al.*, 2004). Ce traitement a de multiples effets sur la flore microbienne ainsi que sur les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles du lait. Tout d'abord, il assure l'innocuité du produit suite à la destruction des microorganismes pathogènes et indésirables (Walstra, 2006). Il crée des conditions favorables au développement des bactéries lactiques et inactive des inhibiteurs de croissance tels que les lactopéroxydases et des enzymes telles que la lipase responsable de l'oxydation des lipides (Walstra, 2006). De même, il réduit les sulfures toxiques et entraîne la production d'acide formique qui est un facteur de croissance pour *Lb. bulgaricus* (Loones, 1994). Le

traitement thermique a également un effet sur la conformation tridimensionnelle des protéines, induisant la modification de leurs propriétés fonctionnelles. Il dénature la majorité des protéines du lactosérum (85%), la résultante est l'association de la caséine et de la β -lactoglobuline via un pont disulfure. Des liaisons entre les caséines et l' α -lactalbumine sont également engendrés (Mahaut, 2000). Au niveau rhéologique, ces modifications se traduisent par une amélioration après fermentation de la fermeté des gels (Jeantet *et al.*, 2007). De plus le traitement thermique entraîne une production plus importante de l'acétaldéhyde, le composé responsable de l'arôme « yaourt » (Ozer et Atasoy, 2002).

4.5. Ensemencement

Le lait enrichi et traité thermiquement, est refroidi à la température de fermentation, 40-45° C. Cette température correspond à l'optimum de développement symbiotique des bactéries lactiques (Lee et Lucey, 2010). Leur inoculation se fait à l'aide d'un levain comprenant exclusivement une ou plusieurs souches de chacune des bactéries spécifiques du yaourt: *St. salivarius* ssp. *thermophilus*, et *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* qui sont inoculées entre 2 et 5% dans le mélange laitier afin d'atteindre une population initiale de l'ordre de 10^7 UFC / ml avec un ratio de 1 :1 (Clark et Plotka, 2004). Ces deux espèces bactériennes vivent en symbiose et en synergie, elles dégradent le lactose en acide lactique, entraînant une baisse du pH et la gélification du milieu avec des modifications structurelles irréversibles. En outre, ces bactéries produisent des composés carbonylés volatiles (l'acétaldéhyde, le diacétyl, l'acétoïne, l'acétate d'éthyle) et des exopolysaccharides qui participent, respectivement, à l'élaboration de l'arôme et de la texture des yaourts (Ott *et al.*, 2000).

Une bonne agitation est nécessaire pour rendre parfaitement homogène le mélange lait-ferment (FAO, 1995). La vitesse d'acidification et le pH final influencent la formation du gel acide. Une vitesse d'acidification lente engendre la formation d'un gel lisse et homogène et donc plus faible (Haque *et al.*, 2001). Le respect du pH final est primordial puisque les propriétés sensorielles (acidité, flaveur et texture) du produit fini en dépendent, c'est pourquoi, lorsque le pH atteint une valeur comprise entre 4,7 et 4,3, un refroidissement en deux temps (rapide jusqu'à 25°C, puis plus lent jusqu' à 5°C) est appliqué afin de stopper la fermentation. En effet, l'activité des bactéries lactiques est limitée pour des températures inférieures à 10°C (Sondi *et al.*, 2004).

4.6. Etuvage

C'est après l'ensemencement que se différencient les procédés de fabrication des yaourts ferme et brassé. Selon la nature du yaourt à fabriquer, on procède soit à une incubation en pots au niveau des chambres chaudes (dans le cas du yaourt ferme) ou à une incubation dans des cuves où il sera brassé (dans le cas du yaourt brassé). Le temps de fermentation se situe entre 3 et 7 h jusqu'à l'obtention d'une acidité finale de 0,9 à 1,2% en équivalent d'acide lactique (Clark et Plotka, 2004).

4.7. Conditionnement et stockage

4.1. 1. Yaourt ferme (dit aussi en pot ou étuvé)

Le laitensemencé est rapidement réparti en pots en plastique (poly-vinyl). Dans le cas des yaourts sucré, aromatisé, aux fruits, à la confiture etc. L'apport d'additifs se fait avant le remplissage des pots (FAO, 1995).

Après le capsulage (aluminium, carton paraffiné), les pots sont placés dans une étuve (à air chaud) ou parfois au bain-marie pour permettre la fermentation. L'acidification dépend de la température et de la durée d'incubation. L'incubation dure environ de 2 à 3 heures. Les pots sont maintenus dans l'étuve jusqu'à l'obtention d'une acidité de 0,75 (au minimum) à 1 % environ d'acide lactique, soit 75 à 100° Dornic. A ce moment, le caillé doit être ferme, lisse et sans exsudation de sérum (FAO, 1995).

Les pots sont alors immédiatement sortis de l'étuve, refroidis le plus rapidement possible à la température de +4 à +5 °C. Ce refroidissement a pour but d'arrêter l'acidification par inhibition des bactéries lactiques. Les pots sont ensuite stockés à +2/ +4 °C pendant 12 à 24 heures de façon à augmenter la consistance sous l'action du froid (FAO, 1995).

4.7. 2. Yaourt brassé

Le laitensemencé est maintenu en cuve ou en tank à la même température que dans le cas des pots (entre 42 et 46 °C) jusqu'à obtention de l'acidité voulue. Celle-ci est souvent un peu plus élevée que pour le yaourt ferme : de 1 à 1,2 % d'acide lactique, soit 100 à 120° Dornic. On procède alors au découpage et au brassage du caillé par l'un des procédés ci-

après: agitation mécanique à l'aide d'un brasseur à turbine ou à hélice; passage du gel à travers un tamis; homogénéisation à basse pression (FAO, 1995).

Le brassage terminé, le caillé est immédiatement et rapidement refroidi à une température inférieure à 10 °C. Le brassage du caillé au cours de la réfrigération améliore l'onctuosité du produit. Le yaourt est ensuite conditionné en pots et conservé à +2 / +4 °C. L'addition éventuelle d'arômes, de pulpes de fruits se fait au moment du remplissage des pots. L'addition du sucre peut se faire avant incubation, à condition de ne pas dépasser 6 % afin de ne pas ralentir la fermentation. Le brassage du caillé au cours de la réfrigération améliore l'onctuosité du produit (FAO, 1995).

4.8. Conservation des yaourts

4.8. 1. Conditions et durée légale de conservation

La durée de conservation du yaourt est autour de trois semaines aux conditions de réfrigération. Le yaourt est toujours en danger de dégradation protéolytique par la protéolyse du lait qui peut se produire pendant l'entreposage au froid due à la croissance des bactéries psychrotrophes (FAO, 1995).

Plusieurs techniques sont utilisées pour garder et améliorer la qualité du yaourt à savoir l'addition de substances chimiques telles que les agents conservateurs (acide ascorbique «E220 », sorbates de sodium «E221 »...), l'injection du gaz (CO₂) dans la surface vide entre le couvercle et l'aliment, utilisation des ondes électromagnétiques (HF, UHF,...), congélation du yaourt (surtout le yaourt brassé, congelé à -25° C), et la stérilisation par la chaleur mais la réfrigération reste toujours la méthode la plus connue pour contrôler l'activité métabolique des ferments et leurs enzymes dans le yaourt au cours du stockage (Adam et Mass, 1999).

5 Qualité du yaourt au cours de la conservation

Si le maintien du yaourt au froid empêche la multiplication bactérienne, il n'arrête pas complètement son activité métabolique. Le yaourt montre des modifications durant toute la durée de conservation, ce qui altère sa qualité (Dave et Shah, 1998).

5.1 Qualité physico-chimique

5.1.1. Post-acidification

La post-acidification a un effet négatif sur la qualité du yaourt et diminue la durée de conservation. Elle est étroitement associée à l'activité métabolique persistante des lactobacilles pendant le stockage à 4° C (Béal *et al.*, 1999). Le pH influe la flaveur et la texture finale du produit et reflète donc la qualité du produit final. Si la valeur de post-acidification est très basse, nous aurons un yaourt très acide avec des problèmes de séparation d'eau (synérèse) et si elle est haute, la flaveur sera affectée en raison d'un manque d'acidité (Tamime et Robinson, 1999). *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *S. thermophilus* sont responsables de la post-acidification du yaourt pendant le stockage au froid (Donkor *et al.*, 2006).

a. Synérèse

La synérèse ou la séparation spontanée du petit lait sur la surface du yaourt est considérée comme un défaut. Ce problème peut être réduit ou éliminé par l'augmentation du niveau des solides du lait à 15% (Shah, 2003).

b. Viscosité

Afin d'accroître la viscosité apparente et la consistance du yaourt, la teneur en matière sèche du lait écrémé est utilisée est augmentée au préalable jusqu'à 10-12% (Schoda *et al.*, 2001). Après concentration (évaporation ou osmose inverse) ou, plus fréquemment, addition de poudre de lait écrémé ou protéines de lactosérum (Mahaut *et al.*, 2000). Des agents de texture (épaississants ou gélifiants) peuvent être ajoutés dans le cas des yaourts brassés sans matière grasse, afin d'améliorer l'apparence, la viscosité et la consistance de ces derniers.

5.2 Qualité microbiologique

La qualité microbiologique du lait et des produits laitiers est influencée par la flore initiale du lait cru, les conditions de la transformation et la contamination après le traitement thermique. Les microorganismes les plus souvent évoqués sont les psychrotrophes Gram négatives, les coliformes, les levures et les moisissures. En outre, diverses bactéries telles que *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, les souches pathogènes d'*E.coli* et les souches entérotoxigènes de *Staphylococcus aureus* peuvent également être trouvées dans le lait et les

produits laitiers. Actuellement, la maîtrise de ces bactéries pathogènes nécessite la mise en place d'un système de contrôle et de surveillance rigoureux (Rodríguez *et al.*, 2003).

La viabilité des bactéries lactiques constitue le plus important obstacle rencontré au cours de la fabrication, et particulièrement pendant le stockage à cause de leur courte durée de vie dans les produits laitiers fermentés (Analie et Viljoen, 2001). Les principaux facteurs responsables de la perte de viabilité des bactéries lactiques ont été attribués à la diminution du pH du milieu et de l'accumulation des acides organiques en raison de la croissance et de la fermentation (Sun et Griffiths, 2000).

5.3 Qualité organoleptique

5.3.1 Fermeté

Le maintien d'une texture et d'une dureté uniformes au cours de la fabrication et pendant toute la période de conservation est le principal objectif dans la production du yaourt. La fermeté du yaourt n'est probablement pas affectée au cours de la conservation (Shakeel Hanif *et al.*, 2012).

5.3.2 Arôme

Les composants aromatiques qui contribuent à l'arôme final du yaourt peuvent être divisés en quatre catégories à savoir les acides non volatiles (lactique et pyruvique), les acides volatiles (butyrique et acétique), les composés carbonyliques (l'acétaldéhyde et le diacétyl) et divers autres composés (acides aminés et les produits formés par la dégradation thermique) (Serra *et al.*, 2009).

5.3.3 Texture

Les différences de texture entre les yaourts sont attribuées au type de lait utilisé et leurs différences compositionnelles (Shakeel Hanif *et al.*, 2012). En effet, un taux élevé de matière sèche totale augmente la fermeté de gel et réduit le degré de la synérèse (Mohammeed *et al.*, 2004).

5.3.4 Goût

La perte du goût du yaourt est le résultat du développement de l'acidité, l'oxydation de graisse ou la protéolyse des protéines (Shakeel Hanif *et al.*, 2012). Les activités protéolytiques des bactéries lactiques peuvent avoir quelques effets nuisibles sur le lait

fermenté. La production des peptides amers est en grande partie attribuée à la protéolyse par *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* pendant le stockage (Gürsoy *et al.*, 2010).

Chapitre 2. L'huile essentielle de *Myrtus communis* L.

1. Histoire de la plante *Myrtus communis* L.

Les baies du myrte ont une longue histoire d'application dans les industries pharmaceutiques. Elles sont utilisées pour leurs effets positifs sur la santé humaine, comme antiseptique, astringent, carminative, tonique des cheveux, analgésique, cardiotonique, diurétique, anti-inflammatoire, stomachique, néphroprotectrice, antidote, hémostatique, tonique du cerveau et antidiabétique (Sumbul *et al.*, 2011)

2. Aspect économique

Le Myrte commun est doté de vertus médicinales notamment utilisé comme antiseptique et désinfectant mais également pour ses propriétés balsamiques. Ce sont les qualités aromatiques et médicinales du myrte qui favorisent son utilisation dans les industries pharmaceutique, cosmétique et agroalimentaire. Dans les régions méditerranéennes, on fait fermenter et macérer les baies pour obtenir de la liqueur et du vin (Barboni, 2006).

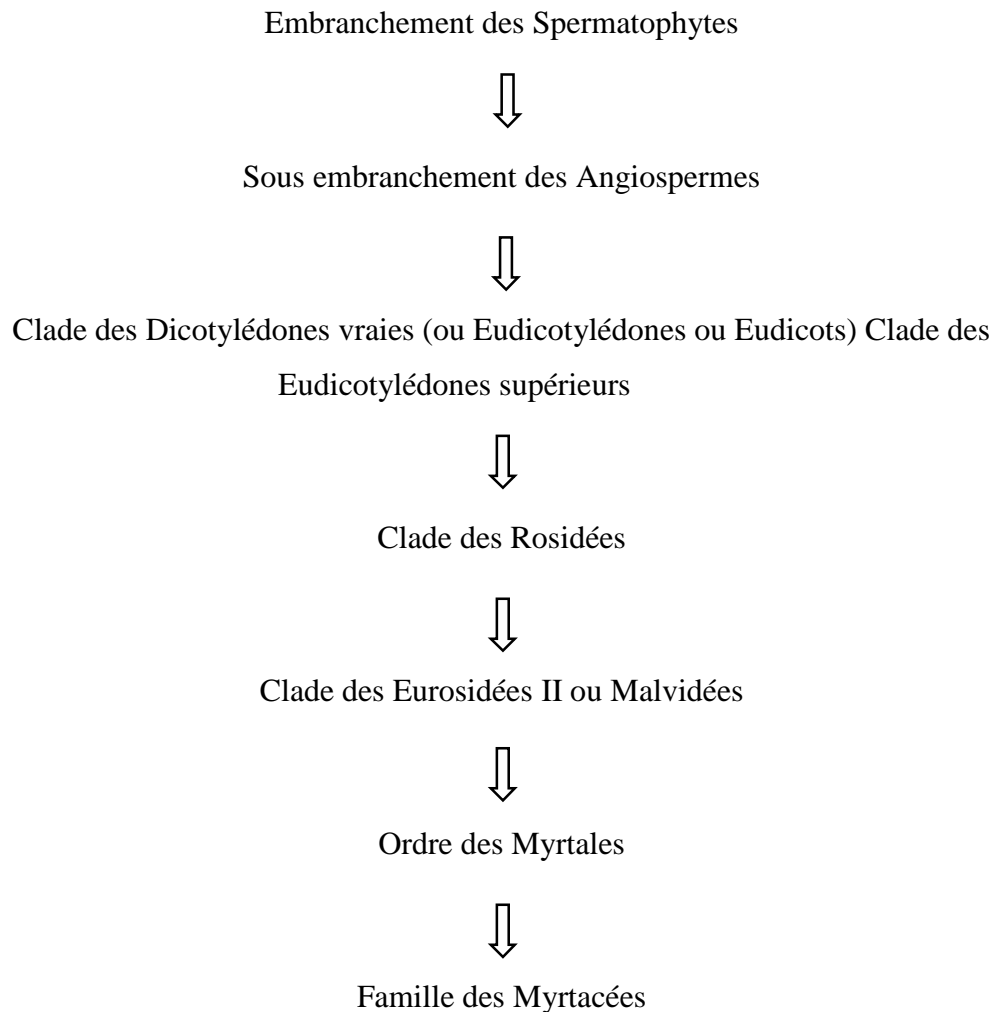
3. Etude botanique de *Myrtus communis* L.

3.1. Généralités sur la famille des Myrtacées

La famille des Myrtaceae est la huitième plus grande famille de plantes à fleurs, en comptant plus de 140 genres et environ 5 600 espèces. La classification APGIII 2009 et les travaux récents de Soltis *et al.* (2011), classent la famille des Myrtaceae au sein des clades suivants: les Angiospermes, les Eudicotyledoneae, les Rosidae, les Malvidae et enfin l'ordre des Myrtales. Les Myrtaceae sont économiquement de première importance pour les industries pharmaceutiques, agroalimentaires ou cosmétiques, sans compter les nombreux composés potentiellement bioactifs qu'il reste à analyser et valoriser.

Afin de classer la famille des Myrtacées, nous allons nous référer à la classification APG, qui est une classification botanique des Angiospermes (Boukef, 1986). Elle est basée sur des études moléculaires. Des séquences de fragments d'ADN sont comparées permettant de mettre en évidence des parentés génétiques. La plus récente des classifications établies par le groupe Angiosperms Phylogeny Group est la classification APG III datant de 2009, qui est une modification de la classification APG II de 2003. Cette récente classification est basée sur deux gènes chloroplastiques et un gène nucléaire de ribosome.

Pour la famille des Myrtacées on va donc avoir :



3.2. L'espèce *Myrtus communis* L.

C'est un arbuste de un à deux mètres de hauteur ; en buissons denses d'un vert brillant. Connue en Algérie sous le nom vernaculaire de Rayhan, elle se remarque par ses fleurs blanches très ouvertes et ses nombreuses étamines en touffe ébouriffée (figure 6). Son odeur aromatique forte et particulière est l'un de ses traits de caractère. La plante renferme de nombreuses poches sécrétrices surtout au niveau des feuilles. Ces dernières sont ovoïdes lancéolées, 2 à 3 fois plus longues que larges, à nervation pennée persistante, opposées, à très court pétiole, coriaces et d'un vert brillant. Les fleurs apparaissent au début de l'été ; elles sont grandes 10-15 mm ; solitaires sur un long pédoncule à l'aisselle des feuilles et très odorantes et pourvues à la base de bractées très petites, rapidement caduques. Les fruits sortent à l'automne, ce sont des baies ovoïdes 6-8 mm noires bleuâtres à peau

charnue, conservant à leur partie supérieure les restes du calice. Ces fruits sont comestibles mais âpres et astringents. Les rameaux sont de taille fine de couleur verte qui se transforme rapidement en brun orangé, pubescents dans leur jeunesse (Barboni., 2006).



Figure 6. *Myrtus communis* L. (canope.ac-besancon.fr)

Sa position systématique a été rapportée par Goetz et Ghedira (2012).

Règne : Plantae

Sous-règne : Eucaryotes

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Myrtales

Famille : Myrtaceae

Genre : *Myrtus*

Espèce : *communis* L.

4. Utilisations thérapeutiques et culinaires du myrte

En nous basant sur différentes études ethnobotaniques, nous avons répertorié quelques utilisations traditionnelles du myrte tout autour de la Méditerranée. Ces études recouvrent des zones qui peuvent s'étendre à l'ensemble d'un pays ou bien à une région précise d'un pays.

En 2013, Bulut *et al.*, Gurdal *et al.* et Sargin *et al.*, travaillent en Turquie. Au total 512 personnes ont été interrogées. Dans le sud-ouest de la Turquie, dans la région de

Marmaris, l'huile essentielle de feuilles de myrte est utilisée par voie cutanée pour traiter les paralysies et les douleurs, et par voie orale pour traiter le diabète. Dans l'ouest de la Turquie dans la région de Turgutlu, les feuilles sont utilisées en décoction pour traiter les affections de la prostate. Toujours dans l'ouest de la Turquie, mais dans la région de Manisa, les feuilles et les fruits sont utilisés en décoction pour traiter l'incontinence et les infections de la vessie.

Bulut *et al.* (2013) notent que l'infusion et la décoction sont les formes de remèdes majoritaires. A elles deux, elles représentent 55,5% des formes utilisées. En Tunisie, d'après Leto *et al.* (2013), les feuilles sont aussi utilisées en décoction pour traiter les douleurs dentaires et comme adoucissant. Dans le nord de l'Algérie dans la région de M'Sila, Boudjelal *et al.*, (2013) interrogent 83 herboristes. 19% d'entre-eux déclarent utiliser *Myrtus communis* comme traitement de l'hypertension et du diabète. Pour cela, ils utilisent les parties aériennes sous forme d'infusion ou de décoction. Au Maroc, les décoctions et infusions de feuilles sont utilisées pour le traitement du diabète dans les régions du Nord, de l'Est et du Sud-est. Dans la province d'Errachidia au Sud- Est, selon Tahraoui *et al.* (2007), le myrte est aussi utilisé en infusion et décoction pour le traitement de l'hypertension artérielle. Selon Ziyat *et al.* (1997), dans l'Est du Maroc, il est utilisé comme antiseptique, astringent, contre les troubles gastro-intestinaux, comme anti-diarrhéique et pour les soins capillaires.

Les baies du myrte ont une longue histoire d'application dans les industries pharmaceutiques. Elles sont utilisées pour leurs effets positifs sur la santé humaine, comme antiseptique, astringent, carminative, tonique des cheveux, analgésique, cardiotonique, diurétique, anti-inflammatoire, stomachique, néphroprotectrice, antidote, hémostatique, tonique du cerveau et antidiabétique (Sumbul, 2011).

Les baies du myrte sont utilisées comme essences aromatiques dans la cuisine, mais leur utilisation la plus importante est la production de liqueurs (Mulas *et al.*, 2002a). Ces fruits sont aussi utilisés pour faire d'excellentes confitures, gelées comme c'est le cas en Sicile (Italie) et Corse (France) (Couplan, 2009 ; Sarl, 2007). Au cours de ces dernières décennies, les systèmes intensifs de la culture du myrte ont été établis dans diverses régions du monde et particulièrement en Sardaigne (Italie), afin d'assurer à la fois un approvisionnement constant de matériel de bons fruits pour l'industrie de liqueur et la préservation des populations de myrte naturelles (Mulas *et al.*, 2002b)

Les valeurs nutritionnelles des baies du myrte ont été déterminées par Aydýn et Özcan (2007). Les constituants sont: huile brute (2.37%), huile essentielle (0.01%), protéines brutes (4.17%), fibres brutes (17.41%), énergie brute (11.21 Kcal/g), sucres réducteurs (8.64%), tannins (76.11 mg/199 g), cendres (0.725%), extrait soluble dans l'eau (52.94%). Dans tout le bassin méditerranéen, les fruits du myrte, frais ou séchés, servent de condiment, en particulier avec la volaille et le gibier. A Chypre et en Turquie, ils sont communément vendus sur les marchés (Couplan, 2009). Le fruit avant la découverte du poivre, servait à assaisonner certains aliments. Les romains l'employaient pour aromatiser l'huile d'olive. Les grecs modernes mangent encore ces baies lorsqu'elles sont mûres. Les oiseaux en sont très avides (Couverchel, 1839).

5. Composition phytochimique de *Myrtus comunis* L.

Les feuilles de *M. communis* ont été étudiées pour contenir de petites quantités d'acides phénoliques (acides caféique, ellagique et gallique) et un flavonoïde, des dérivés de quercétine (quercétine 3-O-galactoside et quercétine 3-O-Rhamnoside). D'autre part, les flavonoïdes tels que les dérivés de galloyles de la catéchine et de la gallo-catéchine ainsi que les dérivés de myricétine sont présents en grandes quantités (Al-Hajjar *et al.*, 2012).

De même, quatre tanins hydrolysables, deux composés polyphénoliques apparentés et quatre glycosides à myricétine ont été isolés des feuilles de *M. communis* dans une autre étude (Yoshimura *et al.*, 2008). Les principaux terpénoïdes et leurs dérivés présents dans les huiles essentielles des feuilles de *M. communis* L. ont été l' -pinène, l' -terpinéol, le linalol, le 1,8-cinéole, le butyrate de géranyle, le géraniol, l'oxyde de caryophyllène et l'acétate de neryl. (Khani et Basavand, 2012). Cinq méroterpénoïdes à base de sesquiterpène avec trois types de nouveaux squelettes [1, 2, 3, (+) - 4 et (-) - 4] ont été isolés des feuilles de *M. communis* (Liu et al, 2016) (Figure 7). Il a été soutenu par une étude qualitative et quantitative

La composition chimique de deux échantillons d'huile de myrte prélevés dans différentes localités a été étudiée par la spectroscopie GC-FID, GC-MS et C13 RMN. Les dérivés de monoterpène ont été les composés principaux: -pinène (50,8 et 33,6%), 1,8-cinéole (21,9 et 13,3%), linalool (2,7 et 14,8%) et l'acétate de linalyle (0.5 et 9.5%) (Bouzabata *et al.*, 2015).

L'analyse chimique de l'extrait d'acétate d'éthyle a révélé la présence de myrecitine-3-O- -rhamnoside. On a constaté que l'extrait d'acétate d'éthyle avait le contenu

phénolique et le flavonoïde total le plus élevé avec les valeurs de 435,37 mg d'équivalents d'acide gallic / g de poids sec et 130,75 mg d'équivalent de quercétine / g de poids sec respectivement (Bouzabata *et al.*, 2015).

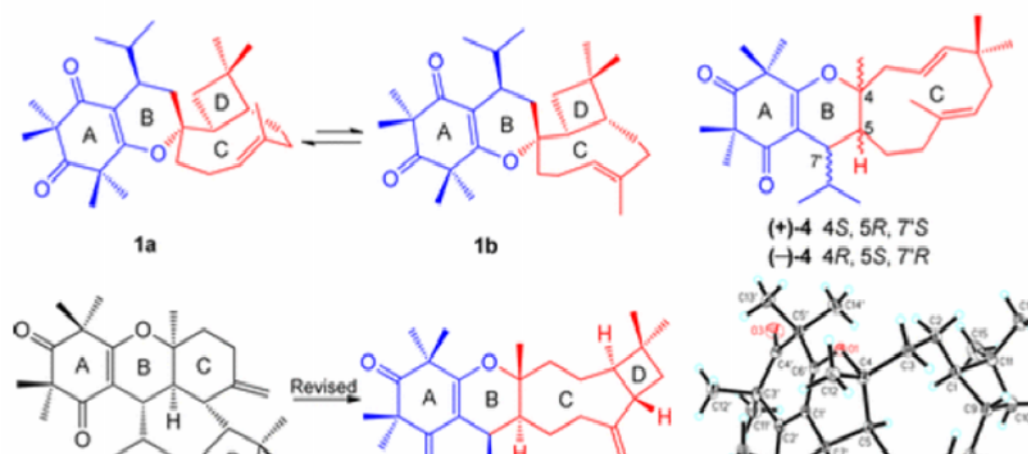


Figure 7. Cinq monoterpénoïdes à base de sesquiterpènes (Liu *et al.*, 2016)

5.1. Les huiles essentielles

5.1.1. Définition

Les huiles essentielles sont des composés naturels complexes de structures organiques variées, liquides, volatiles, limpides et odorantes, synthétisées par des plantes aromatiques et médicinales comme métabolites secondaires (Bakkali *et al.*, 2008). Elles sont insolubles dans l'eau et solubles dans l'alcool et les solvants organiques. Elles ne contiennent pas de corps gras, leur appellation «huile» vient de leur caractéristique hydrophobe et le terme «essentielle» de leur caractéristique d'odorat (Bouhdid, 2009). Les huiles essentielles sont très sensibles aux variations de température, à la lumière et à l'oxygène.

Dans la nature, les huiles essentielles jouent un rôle important dans la protection des plantes contre les phytopathologies d'origine antibactérienne, antivirale ou antifongiques mais aussi contre les insectes ravageurs et contre les herbivores; elles jouent aussi un rôle dans l'attraction des insectes avantageux pour favoriser la dispersion de pollens et de graines (Bakkali *et al.*, 2008). Les huiles essentielles exercent aussi un effet allélopathique en inhibant la germination et le développement d'autres espèces dans leur voisinage (De feo *et al.*, 2002). Elles peuvent être synthétisées par tous les organes ou

structures sécrétrices des plantes à savoir les fleurs, les feuilles, les tiges, les graines, les fruits, les racines, du bois ou l'écorce et sont stockées dans des cellules sécrétoires, des cavités sécrétrices, des canaux sécréteurs ou trichomes glandulaires et qui sont souvent localisés sur ou à proximité de la surface de la plante (Burt, 2004 ; Bakkali *et al.*, 2008 ; Solórzano Santos et Miranda-Novales, 2012).

5.1. 2. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels de structures complexes qui peuvent contenir de multiples composants à différentes concentrations. La composition chimique et le rendement en huile essentielle d'une plante peut être influencé par plusieurs facteurs à savoir la saison de récolte, la zone géographique d'origine, la partie de la plante utilisée, le stade de développement de la plante, les conditions environnementales (climat, nature du sol, pollution), séchage et stockage de la plante ainsi que la méthode d'extraction (Faleiro *et al.*, 2002; Hyldgaard *et al.*, 2012). A l'intérieur d'une même espèce végétale, on peut observer des variations chimiques qualitatives et quantitatives, ce qui conduit à l'existence de chimiotype, par exemple un thymus à thymol (Amarti *et al.*, 2010), à carvacrol (Nejad *et al.*, 2008 ; Ghasemi *et al.*, 2011) ou à bornéol (Ait-Ouazzou *et al.*, 2011a). Cette variation du profil chimique pourra entraîner la variation de ses propriétés biologiques.

La technique la plus couramment utilisée pour la détermination de la composition des huiles essentielles est le couplage d'une technique de Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG) avec une technique spectroscopique, la Spectrométrie de Masse (SM). La CPG permet la séparation de composés volatils de mélanges complexes et une analyse quantitative des résultats à partir d'un volume d'injection réduit, cependant les informations obtenues ne sont pas suffisantes pour une caractérisation totale des composants d'une huile essentielle, mais on peut faire une approximation en comparant le temps de rétention du composé avec des substances de référence. La SM permet l'identification des constituants par comparaison des données spectrales avec celles de produits de référence contenues dans des bibliothèques de spectres. L'utilisation de la CPG couplé à la SM permet de combiner les qualités de séparation de la première avec les propriétés analytiques de la seconde et permet une identification rapide des constituants des huiles essentielles (Yadegarinia *et al.*, 2006).

Les huiles essentielles sont caractérisées par des composants majeurs à hautes concentrations avec d'autres composants présents en traces ou en moindre pourcentage. Les huiles essentielles sont composées de deux groupes principaux d'origine biosynthétique distincte, de poids moléculaire bas à savoir les terpènes et l'autre groupe est composé de constituants aromatiques et aliphatiques dérivés du phénylpropane et des composés spécifiques contenant du soufre ou de l'azote (Bakkali *et al.*, 2008).

5.1. 2.1. Terpènes et terpénoïdes

Les terpènes forment structurellement et fonctionnellement différentes classes. Ils sont fait de la combinaison de plusieurs unités de 5 carbones-bases appelés isoprène (C₅H₈) et peuvent être à chaîne ouverte ou cyclique (Bakkali *et al.*, 2008; Hyldgaard *et al.*, 2012). Les principaux terpènes sont les monoterpènes (C₁₀) et les sesquiterpènes (C₁₅), mais on trouve aussi des hemiterpènes (C₅), diterpènes (C₂₀), des triterpènes (C₃₀) et des tétraterpènes (C₄₀). La synthèse se fait via la voie de l'acide mévalonique à partir de l'acétyl-CoA (Hyldgaard *et al.*, 2012). Un terpène contenant un oxygène est appelé terpénoïdes (Cowan, 1999).

Les monoterpènes et les sesquiterpènes sont les molécules les plus représentatifs dans le règne végétal. On peut distinguer :

- a. Les monoterpènes hydrocarbonés: tels que pinène, 3-carène, myrcène, sabinène etc.
- b. Les monoterpènes oxygénés ou monoterpénoïdes :
 - Alcools : géranol, linalol, menthol, bornéol etc ;
 - Aldéhydes : néral, géranial etc ;
 - Esters : Acétate de linalyl, acétate de myrthenyl, acétate de géranyl etc ;
 - Ethers : 1,8 cinéole (eucalyptol) etc ;
 - Phénols : thymol, carvacrole etc ;
 - Cétones : pulégone, menthone, camphre, carvone etc ;
- c. Les sesquiterpènes hydrocarbonés : tels qu'azulène, élémène, -caryophyllène etc.
- d. Les sesquiterpènes oxygénés ou sesquiterpénoïdes : tels que cédrole, cadinène, germacrone, caryophyllène oxyde etc.

5.1. 2.2. Composés aromatiques dérivés du phénylpropane

Ils dérivent du phénylpropane et sont moins fréquents que les terpènes (Bakkali *et al.*, 2008). Ils sont caractérisés par un noyau aromatique lié à une chaîne de trois atomes de

carbone propène (Hyldgaard *et al.*, 2012). Cependant, ces composés sont importants sur le plan qualitatif et quantitatif chez certaines espèces; le cinnamaldéhyde est le composant majoritaire de l'huile essentielle du *Cinnamomum verum* (cannelle) et l'anéthole composant majoritaire de l'huile essentielle de *Pimpinella anisum* (anis) (Rodrigues *et al.*, 2003) et ceux qui ont été le mieux étudiés sont l'eugénol, l'isoeugénol, la vanilline, le safrole et le cinnamaldéhyde. Certaines huiles essentielles peuvent contenir des composés spécifiques contenant du soufre ou du nitrogène tel que l'allicin et allyl-isothiocyanate (Svoboda et Hampson, 1999).

Dans les huiles essentielles des feuilles de myrte algérien, quelle que soit la méthode d'extraction utilisée, l' α -pinène et le 1,8-cinéole sont les principaux composants (Brada *et al.*, 2012), semblable au myrte tunisien, ainsi qu'au myrte français (Chalchat *et al.*, 1998). La variation quantitative et qualitative sur le plan chimique est aussi présente entre organes (Brada *et al.*, 2012), les feuilles sont riches en monoterpènes (51,30%) tandis que les fruits sont riches en monoterpènes oxygénés (71,2%). Par contre, le contenu en sesquiterpènes est très faible (1%) pour les feuilles et assez grande (16%) pour les baies.

Les résultats montrent également que l'HE des feuilles est riche en α -pinène et 1,8-cinéole alors que l'HE du fruit se caractérise par une grande quantité de linalool, estragole, 1,8 cinéole et une quantité appréciable de bergamotène et E-caryophyllène. L'HE des fruits de myrte algérien est différente de celles rapportées par la littérature et se caractérise par une composition typique: linalol/estragole/1,8 cinéole.

6. Activités biologiques des huiles essentielles de *Myrtus comunis* L.

6.1. Effet antibactérien

Les propriétés antibactériennes des huiles essentielles de myrte et des autres extraits contre les bactéries pathogènes ont été signalées dans de nombreuses études et ont obtenu des résultats prometteurs. Dans l'étude d'Akin *et al.* (2010), l'huile essentielle de *Myrtus communis* montre une activité considérable contre la plupart des bactéries Gram-négatives et positives à une concentration de 0,5% (v / v). Des résultats similaires ont été rapportés par Rossi *et al.* (2007) pour diverses huiles essentielles corses et notamment l'huile essentielle du myrte commun. Cette dernière a inhibé la croissance de *Staphylococcus aureus* ainsi que *Escherichiacoli* mais n'a pas d'effet sur *Enterobacteraerogenes* et *Pseudomonas aerogenes*. Les auteurs expliquent l'action

antibactérienne contre *E. coli* par la grande quantité d' α -pinène de l'HE de *Myrtus communis* (α -pinène, 52% et 1,8-cinéole, 30,1%).

Deriu *et al.* en 2007 remarquent que l'HE extraite des feuilles durant la floraison sont également efficaces avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de 0,075 à 2,5% (v,v) contre *Helicobacter pylori*, qui est une cause principale de l'ulcère gastrique et duodénal.

Gündüz *et al.* En 2009 montrent une activité antibactérienne contre l'agent pathogène d'origine alimentaire *Salmonella typhimurium* lorsque les légumes sont lavés avec une concentration de 500-1000 ppm de l'HE extraite des feuilles de myrte. Ces résultats suggèrent que cette dernière pourrait être utilisée comme une alternative au chlore ou d'autres désinfectants synthétiques, pour laver les fruits et légumes, en particulier pour les produits biologiques.

Dans l'étude de 2010 de Zanetti *et al.*, l'HE de myrte montre une activité contre des bactéries résistantes bien connues comme *Mycobacterium tuberculosis*, à une CMI de 0,17% (v,v), et *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculose (CMI > 2%).

6.2. Effet antifongique

La gestion des infections fongiques possède de nombreux problèmes, y compris le nombre limité de médicaments antifongiques, la toxicité et la résistance aux médicaments antifongiques utilisés couramment. Il est donc nécessaire de découvrir de nouveaux agents antifongiques pour lutter contre les souches exprimant une résistance aux médicaments antifongiques disponibles.

Mahboubi et Ghazian Bidgoli en 2010 évaluent l'activité antifongique de l'HE de *Myrtus communis* contre *Candida albicans* et d'autres espèces (*Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus* et six isolats d'*Aspergillus flavus*). Les valeurs de CMI et de CML vont respectivement de 8-32 μ l / ml pour *C. albicans* et *Aspergillus* sp..

En 2013, Cannas *et al.* Testent l'activité antifongique du myrte contre différentes espèces de *Candida*. A première vue, les résultats obtenus semblent inférieurs à ceux de Mahboubi et Ghazian Bidgoli. Cette différence est probablement due à la différence de composition entre l'huile turque utilisée par Mahboubi et Ghazian Bidgoli et l'huile italienne utilisée par Cannas *et al.*. L'huile italienne montre une bonne activité contre *C. albicans*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis* après 24 à 48 heures avec des CMI_{90s} allant de 2 à

4 µl / ml. Cette HE contient 11% d' α -pinene, 16% de 1,8-cineole 12% de linalool 7% d' β -terpineol et 5% de limonene.

En outre, Bianchi *et al.* (2003), testent, *in vitro*, l'action de l'HE de *Myrtus communis* contre les champignons phytopathogènes tels que *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* et *Colletotrichum lindemuthianum*. L'HE de *Myrtus communis* inhibe de 60% la croissance de champignons à une concentration de 1600 ppm. L'observation microscopique révèle que l'HE a provoqué des modifications morphologiques des hyphes de tous les champignons testés.

6.3. Effet antiviral

Le nombre de publications concernant les effets anti-viraux du myrte semble réduit. Donc nous nous intéresserons seulement à son action sur l'herpès simplex-1 (HSV-1). Le virus de l'herpès simplex peut provoquer diverses infections comme l'herpès labial, l'encéphalite et la kérato-conjonctivite entre autres. Dans certains cas, ces maladies peuvent même entraîner la mort du patient.

Une étude menée par Oulia *et al.* En 2007 a conduit à la conclusion que l'HE de myrte iranien peut être utilisée en tant que traitement d'infections à herpès simplex. Les résultats ont montré que la création de vésicules dans le groupe traité avec l'HE (5, 10 et 15 mg / ml) a été retardée par rapport au groupe témoin (vaseline). Les résultats montrent aussi clairement un retard dans la mise en place de pustules chez le groupe traité avec l'HE à 15 mg / ml de concentration par rapport au groupe traité à 5 et 10 mg / ml de concentration. Cette étude montre bien qu'à la concentration de 15 mg / ml, l'HE de myrte commun retarde la création de pustules et pourrait être utilisée dans le contrôle ou le traitement de l'herpès simplex.

6.4. Effet anti-inflammatoire

Les éicosanoïdes sont des médiateurs lipidiques qui peuvent être produits rapidement afin de moduler les événements précoces de l'inflammation. Dans le but d'évaluer chez l'animal l'effet anti-inflammatoire, Rossi *et al.* (2009) ont étudié les effets du Myrtucommulone (MC) sur l'inflammation dans des modèles *in vivo*. Le MC a été administré à des souris par voie intra péritonéale, et un œdème de la patte et de la pleurésie ont été induits, par l'injection sous-plantaire et intra pleurale de carragénine, respectivement. Le traitement ip. (intra péritonéal) des souris avec le MC (0,5, 1,5, et 4,5 mg / kg) a réduit le développement de l'œdème induit par la carragénine à 4 et 6 h d'une

manière dépendante de la dose. Le MC semble être plus puissant que l'indométhacine, ce qui confirme une efficacité anti-inflammatoire remarquable de ce composé *in vivo*.

6.5. Toxicité

Aucun danger pour la santé ou d'effets secondaires ne sont rapportés à la suite d'une bonne administration aux doses thérapeutiques. En 1979 Uehleke et Brinkschulte-Freitas étudient la toxicité de l'huile essentielle de myrte. Les auteurs observent à des doses supérieures à 3 ml / kg d'huile essentielle les symptômes consécutifs suivants : au bout d'1 à 2 h: augmentation de la motilité, léchage fréquent des pattes, perte de coordination, fourrure érigée, tremblements, paralysie des pattes postérieures, convulsions cloniques courtes, cyanose, dyspnée, perte des réflexes de redressement et narcose.

Mahmoud *et al.* (2010) testent la toxicité de l'huile essentielle, de l'extrait aqueux et de l'extrait éthanolique du myrte égyptien. Les principaux composés de l'huile essentielle étaient le 1,8-cinéole (27,19%), l' α -pinène (25,53%) et le linalol (11,75%). L'étude de la toxicité aiguë de l'huile essentielle, de l'extrait aqueux et alcoolique des feuilles de *Myrtus communis* a montré que les DL_{50s} sont de 6,4; 10 et 10 g/kg, respectivement.

7. Procédés d'extraction des huiles essentielles

7.1. Méthodes traditionnelles d'extraction des HEs

Ces techniques d'extraction reposent toutes sur le même principe, basé sur l'entraînement des molécules volatiles de la plante par la vapeur d'eau. Le degré de contact entre la plante et l'eau est le seul paramètre qui diffère.

7.1.1. Hydrodistillation

Dans le cas de l'HD, la plante se trouve dans un réacteur où elle est en contact direct avec l'eau bouillante. Selon la densité ou la quantité de la plante utilisée, elle peut flotter ou être complètement immergée dans l'eau. Elle est généralement conduite à pression atmosphérique. Le chauffage permet l'éclatement et la libération des molécules volatiles contenues dans la matière végétale. La vitesse de vaporisation des composés volatiles des plantes aromatiques et médicinales (PAM) par l'hydrodistillation est connue par la variation de leur concentration en fonction de la résistance à la diffusion de l'HE dans les tissus cellulaires et également selon la solubilité des molécules volatiles dans l'eau (AFNOR, 1980).

7.1. 2. Entraînement à la vapeur

C'est le moyen le plus répandu pour extraire les molécules volatiles des PAM. Le matériel végétal n'est pas en contact avec l'eau, mais la vapeur d'eau produite par une chaudière est injectée et traverse la matière végétale de bas en haut, éclate les cellules et entraîne les molécules volatiles. En traversant un tube réfrigérant, la vapeur d'eau saturée en composés volatils se condense en un mélange hétérogène composé d'HE et d'hydrolat (Marrouf, 2009 ; Bruneton, 1999). On peut également récupérer la phase aqueuse, comportant une faible proportion de composés aromatiques, qui porte alors le nom d'eau florale

7.1. 3. Expression à froid

C'est une technique "physique" simple où les écorces des agrumes (citron, orange,...) sont pressées à froid pour extraire leurs HEs en utilisant des rouleaux ou des éponges. Aucune source de chaleur n'est utilisée, laissant ainsi à l'huile une odeur très proche de l'original. Le principe de cette méthode consiste à faire éclater par différents procédés mécaniques (compression, perforation) les poches qui sont situées à la superficie de l'écorce de ces fruits renfermant l'HE. L'huile libérée est ensuite recueillie par un courant d'eau (Marrouf, 2009 ; Bruneton, 1999).

7.1. 4. Extraction par solvant organique

L'extraction par solvant organique à chaud est actuellement largement utilisée. Le principe de cette méthode consiste à faire tremper les plantes dans un solvant organique volatil à chaud, soit pour obtenir des produits que l'on ne peut extraire par un autre procédé, soit en vue de rendements plus élevés (Marrouf, 2009). Dans l'appareillage Soxhlet, un système de régénération interne du solvant permet de mettre en contact en permanence le végétal avec du solvant pur. Le choix du solvant est influencé par des paramètres techniques et économiques : sélectivité, stabilité, inertie chimique et température d'ébullition pas trop élevée pour permettre son élimination totale (Bruneton, 1999).

7.2. Méthodes innovantes d'extraction des HEs

7.2. 1. Hydrodistillation assistée par ultrasons

Il s'agit dans ce cas précis d'un traitement de la plante «pré» ou «post» opératoire. En effet, la structure des parois des plantes et les tissus cellulaires se désorganisent, sous

l'effet des ondes ultrasonores et les micros cavitations générées par les ultrasons (Romdhane, 1993). Ainsi, ces changements favorisent la diffusion de l'eau dans les tissus cellulaires, ce qui peut également influencer sur la cinétique d'extraction des molécules aromatiques des HEs. Les principaux avantages de ce procédé sont l'accélération de la cinétique d'extraction et l'amélioration du rendement.

7.2. 2. Extraction assistée par micro-ondes

C'est une technique récente développée dans le but d'extraire des produits naturels comparables aux HEs et aux extraits aromatiques. Dans cette méthode, la plante est chauffée par un rayonnement micro-ondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle: les molécules volatiles sont entraînées dans le mélange azéotrope formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée (Marrouf, 2009). Ce chauffage, en vaporisant l'eau contenue dans les glandes oléifères, crée à l'intérieur de ces dernières une pression qui brise les parois végétales et libère ainsi le contenu en huile. Les auteurs de ce procédé lui attribuent certains avantages tels que le temps d'extraction (dix à trente fois plus rapide), l'économie d'énergie et une dégradation thermique réduite (Huie, 2002).

Partie 2 :
« Partie expérimentale »

Chapitre 1 :
« Matériel et Méthodes »

Objectif de l'étude

Notre expérience a été réalisée en deux parties : l'extraction de l'huile essentielle à partir des feuilles de *Murtus communis L.* a été réalisée au sein du laboratoire de biochimie à l'Université de Mostaganem et l'essai d'addition de l'HE extraite au yaourt brassé au sein du laboratoire des sciences et technique de production animale de Hassi-Mameche, appartenant à l'université de Mostaganem. L'objectif de la présente étude est d'observer l'effet de l'addition de l'huile essentielle extraite du myrte sur la conservation du yaourt brassé fabriqué à l'échelle du laboratoire ainsi que son influence sur la viabilité de la flore lactique pendant le stockage.

Matériel

2.1. Matériel végétal

La plante *Myrtus communis L.* a été collectée au niveau de la région de Chlef pendant le mois du Mars de l'année en cours. Les feuilles ont été séparées pour servir à l'extraction de l'huile essentielle par un dispositif d'entraînement à la vapeur d'eau.

2.2. Matériel biologique

2.2. 1. Les ferments lactiques

Dans cette étude, nous avons utilisé des ferments lactiques thermophiles industriels de culture mixtes (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*) lyophilisés pour ensemencement direct. Ces ferments nous ont été fournis par la laiterie vallée des jardins Debdaba-Mostaganem.

Les ferments lactiques lyophilisés pour ensemencement direct du lait sont commercialisés généralement dans des sachets en aluminium imperméables à l'eau et à l'air (figure 8). Ces derniers peuvent se conserver douze mois à +4°C et jusqu'à dix-huit mois à -18°. Nous avons pris les mesures nécessaires pour les transporter au laboratoire en respectant la chaîne de froid en utilisant la glacière.

- pH mètre : pour ajustement et mesure du pH ;
- Bain marie ; pour fondre les milieux de cultures
- Réfrigérateur : pour conserver les milieux de culture, produits et réactifs à basse température ;
- Balance de précision : pour les différentes pesées ;
- Vortex : pour l'homogénéisation des dilutions ;
- Microscope électrique : pour l'observation en immersion ;
- Agitateur magnétique pour l'homogénéisation des différents milieux préparés ;
- Autoclave pour la stérilisation des milieux de culture et du matériel utilisé ;
- Plaque chauffante : pour pasteurisation du lait et préparation des milieux de cultures ;
- Anse de platine : pour le prélèvement des colonies ;
- Micropipette et embouts : pour les dilutions ;
- Râteau : pour l'étalement ;
- Bec bunsen.

2.2. 4. Milieux de culture

Pour dénombrer les bactéries lactiques du yaourt brassé, nous avons utilisé les milieux gélosés conventionnels MRS et M17 dont les définitions et compositions sont rapportées en annexe.

- **Milieu MRS** (Gélose de Man, Rogosa, Sharpe) (De Man et al, 1960) pour dénombrer les *lactobacillus bulgaricus* ;
- **Milieu M17** (Terzaghi et Sandine, 1975) pour dénombrer les *streptococcus thermophilus* ;
- **Milieu PCA** (Plate Count Agar) pour dénombrer de la Flore mésophiles aérobies totales présente dans le yaourt ;
- **Diluant** : Eau peptonée pour la préparation des dilutions.

2.2. 5. Réactifs chimiques et autres produits

2.2. 5.1. Réactifs de la coloration de Gram (Giraud, 2003)

- Solution de violet de gentiane ;
- Solution de Lugol ;

- Alcool ;
- Solution de fuchsine.

2.2. 5.2. Autres réactifs

- Eau oxygénée : pour la recherche de la catalase ;
- Solution de NaOH N/9 ;
- Phénolphtaléine.

3. Méthodes

3.1. Extraction de l'huile essentielle

L'huile essentielle a été extraite des feuilles de *Myrtus communis* L. par la méthode d'entraînement à la vapeur d'eau (figure 9). Le principe de cette méthode consiste à récupérer l'huile essentielle (HE) des végétaux, en faisant passer à travers ces derniers un courant de vapeur d'eau, qui va entraîner ces composés volatils. La matière végétale à traiter n'est pas mise en contact direct avec l'eau. La vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile (El Haib, 2011).



Figure 9. Dispositif d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau (photo originale)

Le rendement de l'huile essentielle est défini comme étant le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante traitée (Carré, 1953). Ce dernier est calculé par la formule suivante :

$$R^{mt} \% = m_1 \cdot 100 / m_0 \quad \text{où} \quad m_1 = \text{masse de l'HE extraite (g)}$$

$$m_0 = \text{masse de la matière végétale utilisée (g)}$$

Pour éviter toute dégradation de l'HE extraite due à l'action de l'air et de la lumière, nos échantillons ont été conservés jusqu'à leur utilisation au réfrigérateur à 4° C dans des tubes en verre stériles bien fermés et couverts avec papier aluminium.

3.2. Préparation des dilutions de l'huile essentielle

L'HE de *Myrtus communis* L. est diluée dans du lait (légèrement chauffé) et bien mélangée avec le vortex afin de bien homogénéiser cette dernière avec le diluant (le lait).

Après la filtration de l'huile essentielle avec une membrane filtrante et à l'aide d'une micropipette et des embouts stériles, nous avons préparés les dilutions suivantes (figure 10) :

D₁ : 500 µl d'HE est introduite dans un tube à essai stérile contenant 4500 µl de lait 10^{-1}

D₂ : 2500 µl de la dilution 10^{-1} est ajoutée à 2500 µl de lait $\rightarrow 5 \times 10^{-2}$.

D₃ : 2500 µl de la dilution 10^{-2} est additionnée à 2500 µl de lait $\rightarrow 2,5 \times 10^{-2}$.

Tableau 3. Les doses testées de l'huile essentielle

Doses	D1	D2	D3
HE en µl	0,1	0,05	0,025
HE en %	10	5	2,5



Figure 10. Préparation des dilutions de l'HE

3.3. Essai de fabrication du yaourt brassé à l'échelle du laboratoire

Afin de mettre en évidence le rôle des microorganismes dans la transformation du lait en yaourt, il faut d'abord enrichir le lait en protéines.

- a. **Préparation du lait** : pour augmenter le taux d'EST du lait à 135g/l, nous avons utilisé deux types de poudre de lait (lait écrémé et entier, c'est le cas d'un yaourt partiellement écrémé), donc nous avons mélangé 57,30g de poudre de lait à 0% de matière grasse et 77,7g de poudre de lait à 26% de MG avec 4 litres d'eau ;
- b. **Pasteurisation** : après homogénéisation, le lait a été pasteurisé à 85°C pendant 10 min, afin d'éliminer les microorganismes indésirables ;
- c. **Ensemencement** : le lait a été refroidi à 42°C, c'est la température idéale pour la croissance *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*, l'ensemencement direct a été fait dans le lait à raison de 0,16% (soit 6,4g pour 4 litres). L'usage d'un thermomètre (figure 11) permet de contrôler la température de pasteurisation et de connaître le moment de l'ajout des ferments ;
- d. **Incubation** : le lait ensemencé était distribué en flacons de 200 ml, puis placés une étuve réglée à 41°C jusqu'à l'atteinte d'un pH de 4,6 ;
- e. **Fin de fermentation et le brassage du coagulum** : la fermentation du yaourt a duré une heure et demi (pH = 6,4), les pots de yaourt ont été refroidi rapidement en les mettant dans la glace pendant 2min pour stopper la fermentation. Ensuite, l'HE a été additionnée (figure 12) et le yaourt a été brassé à l'aide d'une tige en verre stérile pour le rendre onctueux.



Figure 11. Préparation du yaourt

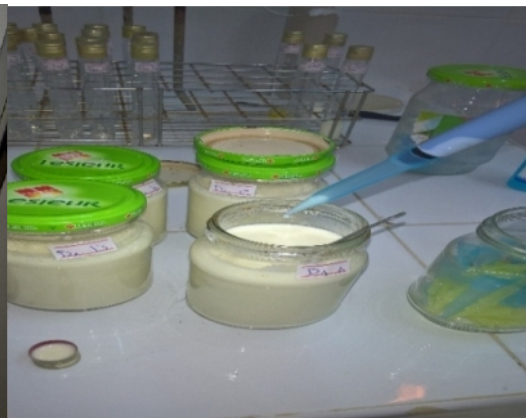


Figure 12. Addition de l'HE

3.4. Addition de l'huile essentielle dans le yaourt brassé

Au moment du brassage, les différentes doses d'HE ont été additionnées (figure 13) avec une concentration adéquate de 0,25ml/250ml (soit 200µl d'HE par 200ml de yaourt). La méthode d'addition de l'HE est résumée par le schéma suivant :

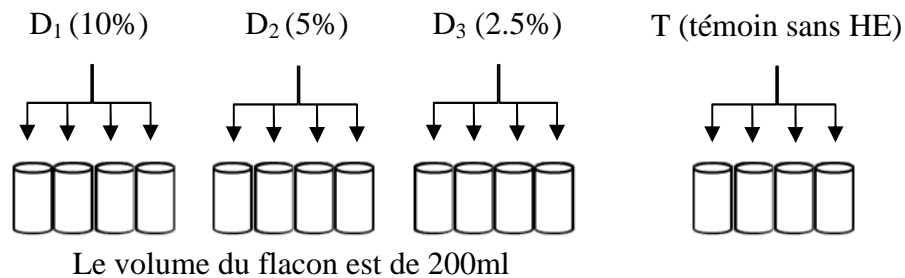


Figure 13. Addition des différentes doses de l'huile essentielle du Myrte

Ensuite le yaourt a été bien homogénéisé puis conservé à 4°C pendant 21 jours.

3.5. Analyses physico-chimiques, microbiologiques et sensorielles du yaourt brassé

Des analyses physico-chimiques et microbiologiques ont été faites une fois par semaine pendant 21 jours de stockage. Le test sensoriel a été réalisé en fin de fabrication du yaourt brassé.

Les paramètres physico-chimiques étudiés selon les recommandations AFNOR sont le pH et l'acidité Dornic (AFNOR, 1993).

La flore lactique recherchée sur le plan microbiologique selon l'IDF est : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*, en plus la FTAM (Flore Mésophile Aérobie Totale) présente dans le yaourt (IDF, 1997).

3.5. 1. Les paramètres physicochimiques

Le suivi de la post acidification du yaourt a été fait en mesurant :

a. Le pH

Le pH a été déterminé par immersion de l'électrode du pH-mètre étalonné dans les échantillons du yaourt. La valeur est lue directement sur l'écran de l'appareil

L'expérience est indépendamment répétée deux fois.

b. L'acidité Dornic

Le principe correspond à la neutralisation totale de l'acide lactique par une solution de soude.

10ml du lait a été prélevé puis titré par la soude Dornic (N/9) en présence de 5 gouttes de phénolphthaléine (indicateur coloré), jusqu'au virage de la couleur au rose pâle persistant au moins 10 secondes (Larpent, 1997).

La mesure de l'acidité titrable se fait par la formule suivante :

$$\text{Acidité (°D)} = 10 \times V \quad \text{où } V : \text{volume versé de NaOH (ml)}$$

3.5. 2. Paramètres microbiologiques

a. Préparation des dilutions

A l'aide d'une seringue stérile, 1ml du yaourt été prélevé de chaque lot et introduit dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau peptonée stérile, on obtient alors la dilution 10^{-1} , à partir de cette dernière on refait la même opération pour aboutir à la dilution 10^{-7} .

b. Dénombrement de la flore lactique

Nous nous sommes concentrés, dans notre étude sur la viabilité de la flore lactique du yaourt préparé à savoir :*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.

Avant d'entamer les techniques de dénombrement, chaque lot doit subir des dilutions décimales.

- Préparation de solution mère :

1 ml du yaourt a été introduit aseptiquement dans un tube à essai stérile contenant 9 ml d'eau peptonée stérile. L'homogénéisation a été réalisée sur vortex Cette suspension constitue alors la dilution mère (DM) qui correspond à la dilution 1/10 ou 10^{-1} .

- Préparation des dilutions décimales :

1 ml de la dilution mère (10^{-1}) a été prélevé aseptiquement à l'aide d'une seringue stérile et introduit dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau peptonée. On obtient ainsi la dilution 10^{-2} et on répète la même procédure en prélevant 1ml à partir de la dilution 10^{-2} et en l'introduisant aseptiquement dans un tube à essai contenant 9 ml du diluant et ainsi de suite. Nous avons préparé ainsi sept dilutions.

Le dénombrement des souches a été réalisé sur gélose MRS pour les lactobacilles, et M17 pour les streptocoques. Les boîtes de Pétri contenant la gélose préalablement coulée et solidifiée a été étalés (0,1 ml) à l'aide d'un râteau stérile et à partir des dilutions (10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7}), puis l'incubation a été faite à 42°C pendant 24-48h pour *St. thermophilus* et 48-72h pour *Lb. bulgaricus* en anaérobiose.

La viabilité se traduit par l'apparition de petites colonies lenticulaires translucides, blanchâtres de petites tailles. (Le ferment est considéré comme indemne de contaminants s'il n'y a aucune autre forme de colonies sur le même milieu) (Idoui *et al.*, 2009).

Le premier dénombrement a été effectué en fin de fermentation et un test catalase ainsi que des examens macroscopique et microscopique ont été faits:

- **Recherche de la catalase**

L'activité catalytique permet la dégradation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau. Elle est mise en évidence en émulsionnant une à deux colonies de l'isolat de la souche à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse, traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester (Guiraud, 2003).

- **Examen macroscopique**

Ce test vise à apprécier la taille des colonies, leurs couleurs et leurs formes, si elles sont opaques ou translucides sur boîte de Pétri.

- **Examen microscopique**

Chaque culture a été soumise à une observation microscopique. Cette observation directe permet d'examiner la morphologie et la structure des cellules afin de distinguer les coques des bacilles et leur mode de regroupement. La coloration de Gram a été faite comme suite :

- Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne ;
- Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute ;
- Ajouter du lugol pendant 30 secondes ;
- Décolorer avec de l'alcool 95°, puis rincer à l'eau ;
- Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir 20 à 30 secondes ;
- Laver à l'eau ;
- Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique à immersion (x100).

c. Dénombrement de la Flore mésophile aérobie totale

La flore mésophile aérobie totale a été recherchée et dénombrée sur gélose PCA par étalement d'un volume de 0,1 ml à partir des dilutions 10^{-5} , 10^{-6} et 10^{-7} . Les boîtes ont été incubées à 30°C, la lecture a été effectuée après 48h.

3.5. 3. Analyses organoleptiques ou sensorielles

Les sens ne se limitent pas à une réaction physiologique mais prennent en compte l'expérience de la personne (jury de dégustation). Les propriétés organoleptiques sont essentiellement :

- L'apparence (couleur, aspect) révélée par la vision.
- La saveur (arôme, saveur) révélée par le goût.
- La texture (résistance, consistance) révélée par le toucher.

L'analyse sensorielle a été effectuée sur cinq échantillons de yaourt :

- Yaourt brassé préparé (sans HE) nature ;
- Yaourt brassé préparé (sans HE) nature additionné du sucre ;
- Yaourt brassé préparé avec l'HE ;
- Yaourt brassé commercialisé nature ;
- Yaourt brassé commercialisé nature additionné du sucre.

La dégustation des 5 échantillons de yaourts brassés (3 préparés et 2 commercialisés) par des sujets ayant été sélectionnée d'après leur disponibilité et leur volonté à participer à ces essais ainsi que leur formation dans le domaine de l'agro-alimentaire ou dans la biologie.

Ces analyses ont été effectuées le jour de la production (J1). Tous les échantillons sont retirés du réfrigérateur avant l'analyse, chaque yaourt est présenté dans des pots et étiqueté avec un code (1, 2, 3, 4 et 5). Les dégustateurs doivent individuellement évaluer chaque type du yaourt. Lorsqu'ils passent d'un échantillon à un autre, ils doivent se rincer la bouche avec de l'eau afin d'effacer le goût de l'échantillon précédent. Les fiches de dégustation sont reproduites en annexe.



Figure 14. Analyse sensorielle du yaourt brassé préparé à l'échelle du laboratoire

Chapitre 2 :
« Résultats et discussions »

Résultat

1.1. Rendement en huile essentielle du myrte

L'extraction de l'huile essentielle de notre échantillon de myrte par entraînement à la vapeur d'eau a fourni un rendement moyen de l'ordre de 0,67 %. L'HE extraite des feuilles de myrte était de couleur jaune claire.



Figure 15. L'huile essentielle de *Myrtus communis* L. (photo originale).

1.2. Analyses microbiologiques, physico-chimiques et sensorielles du yaourt brassé

1.2. 1. Analyses microbiologiques

1.2. 1.1. Suivi de la viabilité des *Streptococcus thermophilus* lors du stockage

L'évaluation de la croissance de *Streptococcus thermophilus* en absence et en présence de l'huile essentielle à différentes doses nous a donné des résultats résumés dans le tableau 6, annexe 2 et sont illustrés par la figure ci-dessous :

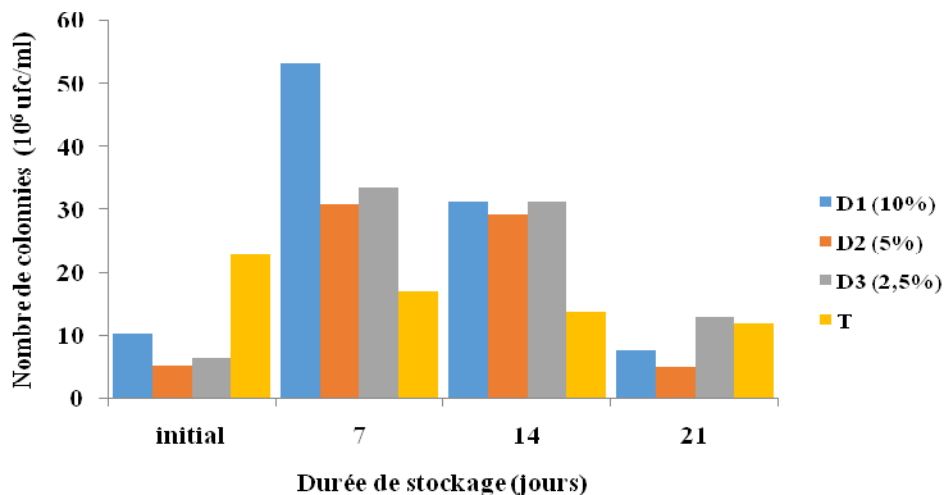


Figure 16, Evolution de la viabilité de *St. thermophilus* lors du stockage.

En fin de fermentation et juste après l'addition de l'HE (10,5 et 2,5%) et le brassage du yaourt, on a procédé au dénombrement de *S. thermophilus* et on a remarqué que cette bactérie ne se comporte pas de la même manière dans les yaourts additionnés d'HE que dans le yaourt témoin. En effet, plus la concentration de l'HE utilisée était forte, plus la viabilité a été affectée. Le nombre de germes viables était de $10,4 \times 10^6$ UFC/ml avec 10% d'HE, $5,4 \times 10^6$ UFC/ml avec 5% d'HE et $6,6 \times 10^6$ UFC/ml avec 2,5% d'HE comparé au témoin qui contenait 23×10^6 UFC/ml.

Après une semaine de stockage, on a observé une élévation régulière de la viabilité de *S. thermophilus* pour les 3 concentrations en huiles essentielles comparativement au témoin. Le nombre de germes viables enregistrés étaient de l'ordre de $53,2 \times 10^6$, 31×10^6 et $33,7 \times 10^6$ UFC/ml pour les 3 concentrations testées (10, 5 et 2,5% d'HE), respectivement. Alors que le témoin ne contenait que $17,1 \times 10^6$ UFC/ml.

A partir du 7^{ème} jour et jusqu'à la fin du stockage, on a enregistré une réduction notable du nombre de cellules vivantes de *S. thermophiles* pour les doses 5% et 10% (5×10^6 UFC/ml et $7,8 \times 10^6$ UFC/ml), respectivement. Contrairement au témoin et le yaourt contenant la plus faible dose d'HE (2,5%) qui renfermaient des taux comparables à savoir 12×10^6 UFC/ml et 13×10^6 UFC/ml, respectivement.

Après culture sur gélose M17, l'observation macroscopique a permis de percevoir de petites colonies bien isolées et distinctes (figure 17) dont les caractéristiques sont mentionnés dans le tableau qui suit :

Tableau 4. Principaux caractères de *St. thermophilus*.

Aspect macroscopique	Coloration de Gram	Aspect microscopique	Test de catalase
Forme : Lenticulaire Couleur : Blanchâtre, Diamètre : Petites colonies Surface : lisse Contour : régulier	+	Coques disposés en paires et surtout en chaînes	-

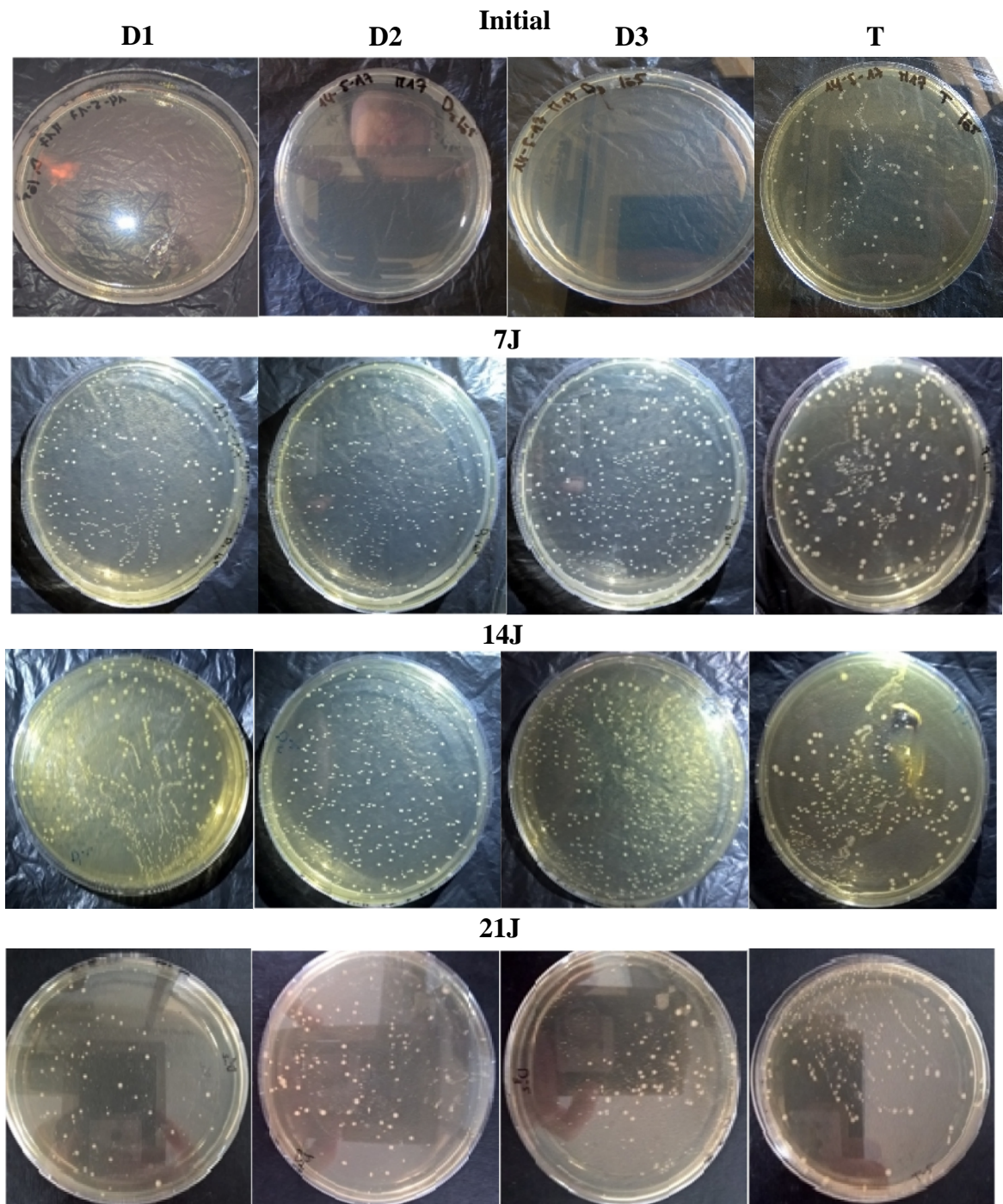


Figure 17. Aspects macroscopiques des colonies de *St. thermophilus* lors du suivi de la viabilité (prélèvement à partir de la dilution 10^{-5}).

Après coloration de Gram, l'observation microscopique a révélé que toutes les bactéries retiennent la couleur violette, ce qui tend à confirmer l'appartenance aux bactéries lactiques. Elle a aussi permis de déterminer la forme et le mode de regroupement (figure 18).

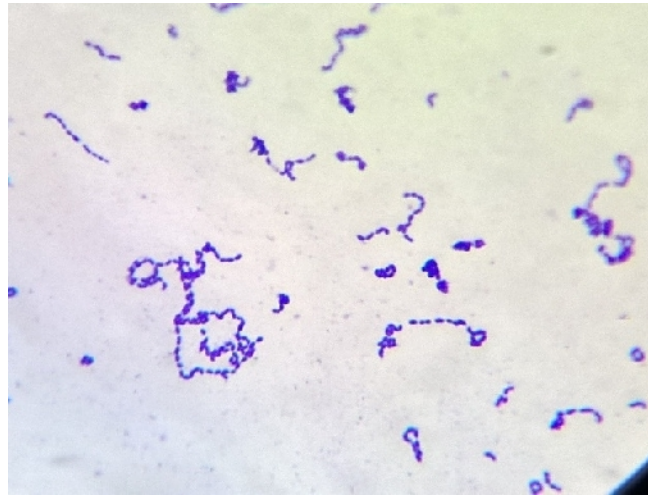


Figure 18. Aspect microscopique des cellules de *St. thermophilus* présent dans le yaourt brassé (x100).

1.2. 1.2. Suivi de la viabilité des *Lb. bulgaricus* lors du stockage

Après 72h d'incubation à 42°C en anaérobiose, aucune colonie n'était apparente sur gélose MRS (pas de croissance de *Lb. bulgaricus*) et ce pour tous nos échantillons. Ce résultat nous a poussés à vérifier la présence de cette bactérie dans le yaourt même. Après coloration de Gram d'une goutte de surnageant prélevé du yaourt préparé et une recherche studieuse sous microscope (x100), on a pu détecter la présence de quelques lactobacilles en très faible quantité sous forme de bâtonnets disposés en longue chainettes (figure 19).

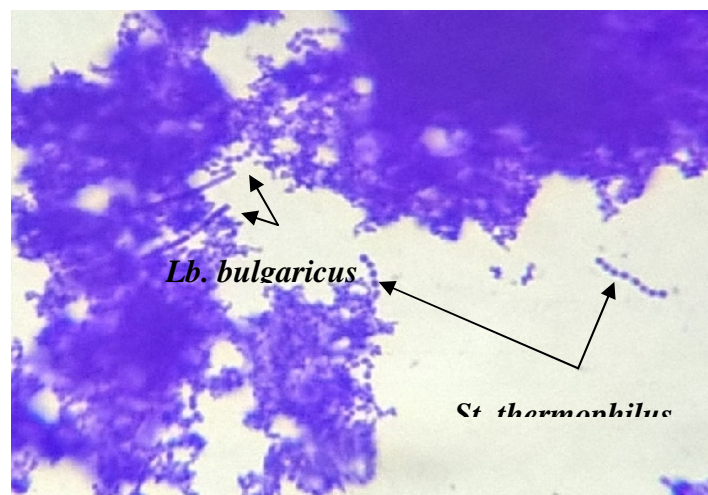


Figure 19. Aspect microscopique des bactéries lactiques du yaourt (x100).

1.2. 1.3. Dénombrement de la Flore totale aérobie mésophile

Les résultats de dénombrement de la flore totale mésophile présente dans notre yaourt brassé après la fin de la fermentation sont résumés dans le tableau 5.

Tableau 5. Dénombrement de la FTAM du yaourt brassé.

La dose d'HE	10%	5%	2,5%	Témoin
Nombre de cellules (UFC/ml)	15×10^7	7×10^7	5×10^7	1×10^7

Les résultats obtenus indiquent clairement la croissance de cette flore était faible lorsque la dose d'HE était faible en enregistrant 15×10^7 pour 10%, 7×10^7 pour 5% et 5×10^7 UFC/ml pour 2,5% d'HE par rapport au témoin qui a enregistré que 1×10^7 UFC/ml.

1.2. 2. Analyses physico-chimiques

1.2. 2.1. Evolution de l'acidité lors du stockage

Les valeurs de l'acidité enregistrées pour les quatre lots de yaourt au cours du stockage à +4°C sont illustrées par les figures 20 et 21. et résumés dans le tableau 7 annexe 2.



Figure 20. Dispositif de titration pour la mesure de l'acidité titrable du yaourt brassé.

Au premier jour du stockage, la valeur d'acide lactique du yaourt brassé additionné d'HE ainsi que le témoin était presque similaire et oscillait entre 81 et 85 ° D. Après 7 jours de stockage, l'augmentation de l'acide lactique était particulièrement évidente pour le yaourt à 10% et 5% d'HE (98 et 90°D, respectivement), mais elle est identique pour le témoin et le yaourt à 2,5% d'HE (85° D).

Après 21 jours de conservation au froid, nous avons enregistré des valeurs d'acidité plus élevées de 125-135°D pour les yaourts à 5% et 10% d'HE et le témoin contrairement au yaourt à 2,5 % d'HE dont l'acidité a légèrement augmenté (94°D).

D'après ces résultats, on constate que l'augmentation du taux de l'acide lactique en présence de l'huile essentielle à des doses élevées est liée à la croissance des *Streptococcus thermophilus*. Les doses appliquées de 10% et 5% d'HE ont pratiquement le même effet. Alors que pour une dose très faible de 2,5 %, la production reste toujours faible pendant la durée du stockage par rapport au témoin.

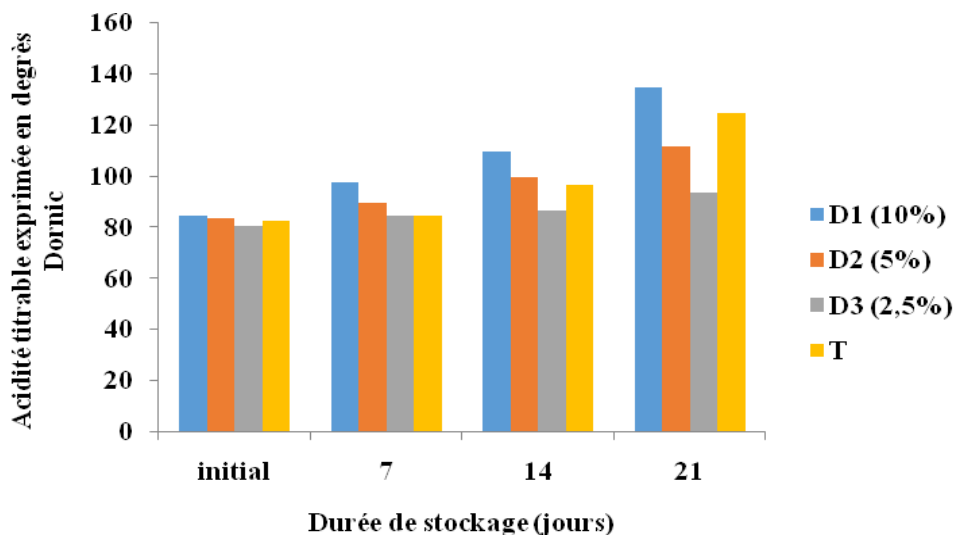


Figure 21. Evolution de l'acidité titrable du yaourt brassé lors du stockage.

1.2. 2.2. Evolution du pH lors du stockage

La figure 22 et tableau 8 (annexe2) illustrent la variation du pH des différents yaourts brassés durant la période de stockage réfrigéré à 4°C.

Nous avons observé que le pH décroît graduellement du premier jour jusqu'à la fin de la période de stockage, la diminution était plus rapide pour le yaourt témoin et le yaourt à 5% d'HE (de 4,6 à 4,1), mais plus particulièrement pour le yaourt à 10% d'HE (de 4,5 à 3,9) par contre au yaourt à 2,5% d'HE qui a marqué une très faible diminution pendant toute la durée de stockage (de 4,6 à 4,3). Résultats concordant à ceux de l'acidité.

D'une manière générale, la valeur du pH du yaourt à 10 et 5% d'HE a été plus faible que celle du yaourt à 2,5% d'HE par rapport au témoin. Cette diminution se traduit par l'augmentation de l'acide lactique.

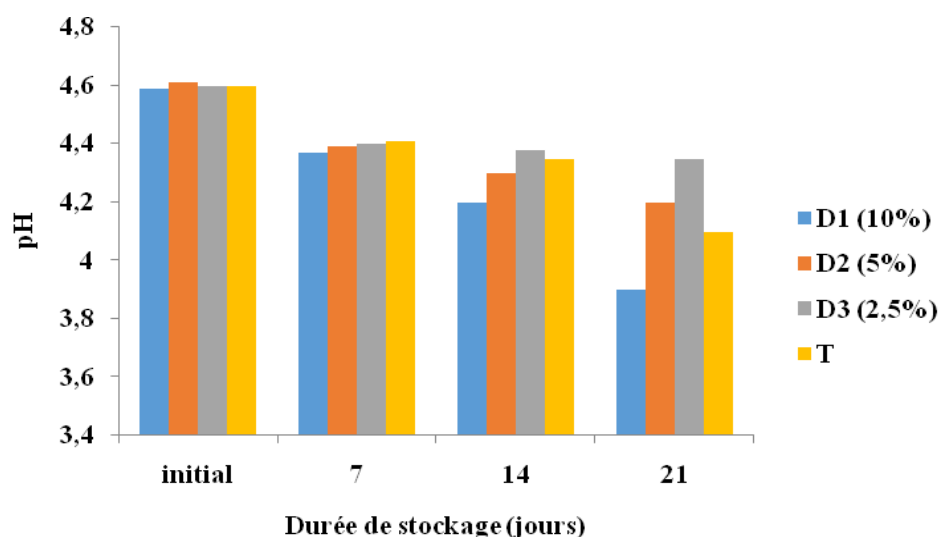


Figure 22. Evolution du pH du yaourt brassé lors du stockage.

1.2. 3. Analyse sensorielle du yaourt

L'étude sensorielle a montré une différence entre l'acceptabilité du yaourt brassé (figure 23 et tableau 9 en annexe 2) à 5% d'HE et du témoin (sucré et non sucré) par rapport aux autres yaourts commerciales. Les yaourts témoins sucré et non sucré ont été les plus acceptés par les dégustateurs. Par contre le yaourt additionné de l'HE a été inacceptable, désagréable et inconsommable à cause de son arôme, odeur et goût.



Figure 23. Aspect du yaourt brassé préparé (photo originale).

2. Discussion

Le rendement obtenu en huile essentielle reste conforme à la littérature. Il est en effet proche de celui rapporté par Zomorodian (2013) qui est de 0,69 % pour la même plante. D'autre part, il représente 2,23 fois que celui rapporté Brada *et al.* (2012) qui est de 0,3% pour la même plante (feuilles de myrte) qui a été récolté pendant le mois du Novembre (2009) de la région de Miliana au Nord-Ouest de l'Algérie. Ainsi que pour Bouzabata *et al.* (2010) dont le rendement variait de 0,2 à 1,2% pour les feuilles de myrte récolté de trois régions au Nord-est de l'Algérie (El Taref, El Kala et Annaba) alors que notre rendement se rapproche à celle qui est récolté de région d'Annaba (0,2 à 0,7%). Les observations faites, ont servi comme base pour dire que les différences des teneurs en HE de *Myrtus comunis* L. sont étroitement liées au moment de la récolte, conditions culturales, facteurs climatiques, dispersion géographique, altitude et nature du sol.

Cette interprétation fut avancée par Bendahou *et al.* (2007) qui préconisent que l'étude complète des HES doit passer par la prise en compte des facteurs édaphiques et pour l'obtention d'un meilleur rendement, il est nécessaire de :

- Choisir une étage bioclimatique semi-aride, tempérée douce.
- Le sol doit être limoneux-argileux-sableux à texture équilibrée ou argilo-siliceux.
- Procéder à l'extraction des huiles essentielles par la méthode d'entraînement à la vapeur d'eau.

D'après les données de la littérature, les proportions individuelles des différents ferments lactiques dans le produit fini ne sont pas identiques à leurs proportions initiales, alors que notre cas le nombre du *St. thermophilus* est plus élevé que celui de *Lb. Delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*. En effet, Bielecka et Majkowska (1998), ont trouvé dans un yaourt nature 1.4×10^9 UFC de *St. thermophilus* /g et 9.9×10^8 UFC de *Lb. bulgaricus* /g, malgré le fait que le lait était inoculé par une proportion identique de ces bactéries.

L'acide lactique est considéré comme le facteur déterminant le rapport entre *Streptococcus* et *Lactobacillus*. En effet, l'acidité du milieu inhibe la croissance de *St. thermophilus* alors que la croissance de *Lb. bulgaricus* ne s'arrête qu'autour de pH 4,4. Cependant, en fin de fermentation *St. thermophilus* domine quasi systématiquement, elle est toujours le principal bénéficiaire de la proto-coopération dont un des effets est

d'augmenter la biomasse finale par rapport aux monocultures (Courtin *et al.*, 2002 ; Courtin et Rul, 2004).

Le suivi de la viabilité des *St. thermophilus* et la flore totale mésophile présente dans notre yaourt brassé pendant toute la durée du stockage de a montré une augmentation de ces dernières et plus la concentration de l'huile essentielle de *Myrtus comunis* était forte, plus la viabilité était plus élevée.

Cette augmentation peut être expliquée par la stimulation de la croissance des *St. thermophilus* par les composés l'huile essentielle de *Myrtus communis*. Tiwari et Pandey (1981) reportent que les HEs et les extraits des plantes ont exercé une inhibition des bactéries lactiques par contre Nes et Skjelkvale (1982), ont constaté que les extraits des plantes dans leurs cas ont stimulé la croissance des bactéries lactiques, ce qui concorde avec nos résultats.

Quant à la diminution de la viabilité des *St. thermophilus* après une semaine du stockage à 4°C peut être expliquée par l'inhibition de la croissance de ces derniers par l'augmentation de l'acidité du yaourt.

Plusieurs auteurs ont avancé des explications à la diminution de nombre des cellules viables lors du stockage. Selon Lankaputhra *et al.* (1996b), l'acidité, le pH et le peroxyde d'hydrogène ont un effet inhibiteur pendant la fabrication et le stockage de yaourt. Par ailleurs, Akalin *et al.* (2004) et Kailasapathy (2006) ont constaté qu'un léger déclin dans le pH pendant le stockage était peu susceptible d'affecter la viabilité. D'autres facteurs, tels que la température de stockage et les différentes concentrations d'acide lactique, sont présumés des facteurs qui affectent la viabilité des microorganismes du yaourt.

La durée de conservation de yaourt peut également interférer avec la qualité de ce produit. De ce fait, quand le yaourt est conservé dans des conditions inadéquates (température), les ferments lactiques tendent à augmenter leur développement ce qui augmente l'acidité et par conséquent provoquent l'auto-inhibition (Tamine et Robinson, 2007).

Cependant, il a été rapporté que la teneur en matière grasse du lait affecte la viabilité des ferments. En effet, les résultats de l'étude menée par Birollo *et al.* (2000) ont

montré que les yaourts à base du lait écrémé ont présenté un nombre de cellules viables plus élevés que celui des yaourts entiers.

La réglementation algérienne exige une concentration totale de bactéries lactiques d'au moins 10^7 UFC/ml. En effet, selon l'arrêté interministériel du 16 Jomada Ethania 1419 correspondant au 7 octobre 1998 relatif aux spécifications techniques des yaourts et aux modalités de leur mise à la consommation : « Les bactéries lactiques thermophiles spécifiques doivent êtreensemencées simultanément et se trouvent vivantes dans le produit fini à raison d'au moins 10 millions de bactéries par gramme rapportées à la partie lactée. » Nous déduisons alors que yaourt à 2,5% d'HE (10^7 UFC/ml) et le témoin (2×10^7 UFC/ml) sont conformes à la réglementation Algérienne.

Selon Luquet et Corrieu (2005), le pH du yaourt doit être dans l'intervalle de 4 à 5, ce qui concorde avec nos résultats pour le yaourt avec 5 et 2,5 % d'HE ainsi que le témoin (4,2, 4,35 et 4,1). Alors que le yaourt à 10% d'HE est très acide (3.9).

Le changement du pH du yaourt pendant le stockage a été rapporté dans plusieurs études. En effet, Dave et Shah (1997a) ont constaté que généralement, le pH du yaourt diminué avec l'augmentation du nombre des cellules de ferment, ces mêmes auteurs (1997b) ont rapporté que le pH des yaourts a diminué après 5 semaines de conservation de 4.16 et 4.40 alors qu'il était à 4.2 pour 5% et 4.3 pour 2,5% d'HE à la fin du stockage.

D'après Donkor *et al.* (2006) pendant le stockage du yaourt au froid, *Lb. Delbrueckii ssp.bulgaricus* et *St. thermophilus* sont responsables de la production d'acide lactique suite à la fermentation du lactose résiduel. Le développement de cette acidité est par contre important non seulement pour la fermentation du lait, mais également nécessaire pour un arôme, une texture et une saveur de yaourt bien-équilibrés (Gürsoy *et al.*, 2010). Reste que l'évolution de l'acidité et les variations de pH au cours de la croissance des souches testées sur le lait écrémé démontrent une différence entre les genres, les espèces et même entre les souches d'une même espèce, vérité scientifique et logique rapportée par Luquet et Corrieu (2005).

Les résultats de l'analyse sensorielle montrent par ailleurs que la saveur est bien exprimée dans tous les produits à l'exception du yaourt avec l'huile essentielle. A cause de son arôme qui est fortement exprimée dans ce dernier. L'ajout de sucre au yaourt naturel masquait le gout acide qui se percevait d'avantage dans le yogourt naturel sans sucre.

Conclusion

Conclusion

Notre étude indique que les résultats de l'ajout de l'huile essentielle de *Myrtus communis* L. à des doses élevés allant de 5% à 10% affecte le comportement des ferments du yaourt brassé et conduit à une augmentation élevée de la viabilité des *St. thermophilus* produisant une grande quantité d'acide lactique. Cette production accrue d'acide lactique conduit à son tour à une rétro-inhibition de la croissance de ces dernières après 15 jours de conservation à +4° C. En revanche, la croissance cellulaire de cette bactérie et la synthèse d'acide lactique ont été conjointement favorisées par l'ajout de l'huile essentielle en faible dose de 2,5% tout au long de la durée du stockage. Par ailleurs, cette influence a permis de conserver la qualité nutritive et fonctionnelle du yaourt brassé durant 21 jours de conservation.

En effet, le yaourt brassé avec l'huile essentielle de myrte était désagréable par les jurys de dégustation à cause de son forte odeur et gout, par contre, le yaourt nature avec et sans sucre ont été les plus appréciés parmi les autres yaourts commerciales.

Enfin, nos résultats montrent que l'huile essentielle étudiée utilisée à faible dose peut être considérée comme agent conservateur promoteur à la place des conservateurs de synthèse pour la production du yaourt brassé capable d'optimiser la viabilité de ses ferments lactiques.

Annexes

Annexe 1

1. Composition des principaux milieux de culture

1.1. Gélose MRS (pH = 6,2 ± 0,2) (De Man *et al.*, 1960)

- Peptone 10,0 g
- Extrait de viande 8,0 g
- Extrait de levure 4,0 g
- Glucose 20,0 g
- Acétate de sodium trihydraté 5,0 g
- Citrate d'ammonium 2,0 g
- Tween 80 1,0 ml
- Hydrogénophosphate de potassium 2,0 g
- Sulfate de magnésium heptahydraté 0,2 g
- Sulfate de manganèse tétrahydraté 0,05 g
- Agar 10 g
- Eau distillée 1000ml
- quelques gouttes de concentré d'acide acétique jusqu'à un pH de 5,5

1.2. Gélose M17 (pH = 6,2 ± 0,2) (Terzaghi et Sandine, 1975)

- Tryptone 5,0 g
- Peptone de soja 5,0 g
- Infusion de viande 5,0 g
- Extrait de levure 2,5 g
- Glycérohydrogénophosphate de sodium 19,0 g
- Lactose 5,0 g
- Acide ascorbique 0,5 g
- Sulfate de magnésium 0,25 g
- Agar 11 g

- Eau distillée 1000ml

1.1. Gélose PCA (pH =7,0 ± 0,2)

- Peptone de caséine 5g

- Extrait de levure 2,5g

- Glucose 1g

- Agar 15g

- Eau distillée 1000ml

Les milieux de culture ont été autoclavés 15 min à 120 °C.

2. Réactifs chimiques et autres produits

2.1. Réactifs de la coloration de Gram (Giraud, 2003)

- Solution de violet de gentiane : 1g de violet de gentiane ; 10ml d'alcool éthylique à 95% ; 2g de phénol ajoutés à 100ml d'Eau distillée ;

- Solution de lugol : 1g d'iodure de potassium ; 1g d'iode ajoutés à 300 ml d'eau distillée;

- Solution de fuschine de ziehl : 1 g de Fuschine ; 10ml d'alcool éthylique à 95% ; 5g de phénol ajoutés à 100ml d'eau distillée.

2.2. Diluants

- Eau peptonée :

Sa composition est riche en peptone (10,0 grammes par litre), le pH est ajusté à $7,2 \pm 0,2$ et le milieu doit être stérilisé à 120°C/15min avant son utilisation.

Annexe 2

Analyses physico-chimiques, microbiologiques et sensorielles du yaourt brassé

Tableau 6. Nombre de colonies comptées de *St. Thermophilus*.

Temps	Initial			7J			14J			21J		
Dilution Dose	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
10%	104	72	62	532	79	53	314	94	1	78	19	ABS
5%	54	7	5	310	87	81	294	46	5	50	11	ABS
2,5%	66	112	ABS	337	49	22	315	46	7	130	50	1
T	230	198	61	171	135	51	140	60	12	120	40	2

Tableau 7. Les valeurs d'acidité titrable exprimée en degré Dornic (D°).

Temps Dose	initial	7J	14J	21J
10%	85	98	110	135
5%	84	90	100	112
2,5%	81	85	87	94
T	83	87	97	125

Tableau 8. Les valeurs du pH mesuré lors du stockage.

Temps Dose	initial	7J	14J	21J
10%	4,59	4,37	4,2	3,9
5%	4,61	4,39	4,3	4,2
2,5%	4,6	4,4	4,38	4,35
T	4,6	4,41	4,35	4,1

Tableau 9. Tableau d'analyse sensorielle comparative des yaourts brassés.

Examen	Nom du produit					Points à examiner	Vocabulaire
	YCB Nature	YCB Nature sucré	YPB nature	YPB Nature sucré	YPB avec l'HE		
1/ <u>Visuel</u>	Lisse, Epais	Lisse, Epais, Brillant	Lisse, Epais, Brillant	Lisse, brillant	Lisse, brillant	<u>Etat du yaourt</u>	Surface : lisse, exsudée, fluide, Etat : fine, épaisse, brillant
	Sableuse onctueux	Ferme	Semi liquide	Semi liquide	Semi liquide	<u>Texture</u>	Texture : ferme, cassante, sableuse, onctueuse, semi liquide
2/ <u>Olfactif</u>	Lactique Lait frais	Lactique naturel	Lactique fermenté	Lactique lait frais	Arôme végétale	<u>Arôme</u>	Lactique : lait frais, naturel, Autres : diacétyl, fermenté, synthétique, arôme végétale
	typée	fade	typée	fade	forte	<u>Intensité</u>	Forte, fade, typée,
3/ <u>Gustatif</u>	Acide Crémeux	Sucrée Crémeux	Acide (sans sucre) Fondant	Sucrée Fondant	Amer	<u>Saveur</u>	Description de la saveur : Sucrée, acide, amer ; Description des sensations : Douceur, crémeux, fondant, onctueux, Description de la finale bouche : Agréable, très typique, riche en arôme, intense, persistante, plutôt courte
	Agréable typée	Agréable typée	Agréable	Agréable	désagréable riche en arôme		

« Références bibliographiques »

A:

- ❖ Accolas J.-P., Bloquel R., Didienne R. et Regnier J. (1977). Propriétés acidifiantes des bactéries lactiques thermophiles en relation avec la fabrication du yoghourt. *Lait*, 57, 1-23.
- ❖ Accolas J.-P., Veaux M. et Auclair J. (1971). Etude des interactions entre diverses bactéries lactiques thermophiles et mésophiles, en relation avec la fabrication des fromages à pâte cuite. *Lait*, 51, 249-272.
- ❖ Adam M.R. et Mass M.O. (1999). *Food microbiology*. 2nd Edition, Royal Society of Chemistry.
- ❖ AFNOR : « Association française de normalisation ». *Bulletin des bibliothèques de France (BBF)*, 1980, n° 8, p. 407-407. Disponible en ligne : <<http://bbf.enssib.fr/consulter/bbf-1980-08-0407-010>>. ISSN 1292-8399.
- ❖ AFNOR/DGCCRF (1993). Contrôle de la qualité des produits alimentaires lait et produits laitiers : analyses physico-chimiques. 4^{ème} édition, Paris, pp. 220-251.
- ❖ Ait-Ouazzou A., Lorán S., Bakkali M., Laglaoui A., Rota C., Herrera A., Pagán R. et Conchello P. (2011a). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Thymus algeriensis*, *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* from Morocco. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(14), 2643-2651.
- ❖ Akalin A. S., Fenderya S. et Akbulut N. (2004). Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharids during refrigerated storage. *International Journal of Food Science*, 39, 613-621.
- ❖ Akin M., Aktumsek A. et Nostro A. (2010). Antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. and *Myrtus communis* L. growing in Northern Cyprus *Afr J Biotechnol*, 9 (4), pp. 531-535.
- ❖ Alakomi H. L., Skytta E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K. et Helander I. M. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *App. Env. Microbiol.* 66(5) : 2001-2005.
- ❖ Al-Hajjar M. A., Al-Shahiry K. F. et Al-Abache S. M. (2012). Isolation and Identification of some active constituents of *Myrtus Communis* in Iraq by using HPLC, FTIR techniques. *Iraqi Natl. J. Chem.* 45:11-22.
- ❖ Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Aarab L., El Ajjouri M. et Chaouch A. (2010). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles

essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 14(1), 141-148.

- ❖ Amiot J., Fournier S., Lebeuf Y., Paquin P. et Simpson R. (2002). Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse. In : *Science et technologie du lait, transformation du lait* (Vignola C. L), 2^{ème} Edition, Lavoisier, Paris, France.
- ❖ Ammor S., Tauveron G., Dufor E. et Chevalier I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1-Screening and characterization of antibacterial compound. *Food Control*. 17: 454-461.
- ❖ Analie L.H. et Viljoen B.C. (2001). Review: Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, 11, 1-17.
- ❖ Angiosperm Phylogeny web site:
www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/welcome.html.
- ❖ APG III (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161, 105-121
- ❖ Atlan D., Béal C., Champonier-Vergès M. C., Chapot-Chartier M. P., Chouayekh H., Coccagn-Bousquet M., Deghorain M., Gadu P., Gilbert C., Goffin P., Guédon E., Guillouard I., Guzzo J., Juillard V., Ladero V., Lindley N., Lortal S., Loubière P., Maguin E., Monnet C., Monnet V., Rul F., Tourdot-Maréchal R. et Yvon M. (2008). Métabolisme et ingénierie métabolique. In : *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec et Doc, Lavoisier, Paris, France.
- ❖ Atlan D., Béal C., Champonier-Vergès M.C., Chapot-Chartier M.P., Chouayekh H., CoccagnBousquet M., Deghorain M., Gadu P., Gilbert C., Goffin P., Guédon E., Guillouard I., Guzzo J., Juillard V., Ladero V., Lindley N., Lortal S., Loubière P., Maguin E., Monnet C., Monnet V., Rul F., Tourdot-Maréchal R. et Yvon M. (2008). Métabolisme et ingénierie métabolique in : *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 271-447.
- ❖ Auclair J. et Portmann A. (1955). Influence du chauffage du lait sur le développement des bactéries. *Ann. Technol. Agric.*, 4, 121-131.
- ❖ Auclair J.-E. et Portmann A., 1958. Influence du chauffage du lait sur le développement des bactéries. *Ann. Technol. Agric.*, 6. 129-150.

- ❖ Axelsson L. (1998). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. 2nd Edition, Marcel Dekker, New York, USA.
- ❖ Axelsson L. (2004). Classification and physiology. In : Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3rd Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 1-66.
- ❖ Aydýn C. et Özcan M. M. (2007). Determination of nutritional and physical properties of myrtle (*Myrtus communis* L.) fruits growing wild in Turkey. Journal of Food Engineering, 79, 453-458.

B :

- ❖ Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. et Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils-A review. Food and Chemical Toxicology, 46, 446-475
- ❖ Barboni, T. (2006). Contribution de méthodes de la chimie analytique à l'amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d'incendie. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de Corse, p26.
- ❖ Béal C. et Sodini I. (2012). Fabrication des yaourts et des laits fermentés, Techniques de l'Ingénieur f6315, Paris-France, 16 p.
- ❖ Béal C., Marin M., Fontaine E., Fonseca F. et Obert J.P. (2008). Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In : Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F. M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 661-765.
- ❖ Béal C., Skokanova J., Latrille E., Martin N. et Corrieu G. (1999). Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt. Journal of Dairy Science. 82, 673–681.
- ❖ Bendahou M. (2007). Composition chimique et propriétés biologiques des extraits de quelques plantes aromatiques et médicinales de l'Ouest Algérien. Thèse de Doctorat d'Etat, Option Biochimie, Université Abou Bah Belkaïd, Tlemcen.
- ❖ Bielecka M. et Majkowska A. (1998). Survival of synergistic sets of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cultures during spray drying of yogurt. Polish Journal of Food and Nutrition Science, 48, 267-274.

- ❖ Birollo G.A., Reinheimer J.A. et Vinderola C.G. (2000). Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt. *Food Research International*, 33, 799-803.
- ❖ Boudjelal A., Henchiri C., Sari M., Sarri D., Hendel N., Benkhaled A. et Ruberto G. (2013). Herbalist's and wild medicinal plants in M'Sila (North Algeria): An ethnopharmacology survey. *Journal of Ethnopharmacology*, 148, p395–402.
- ❖ Bouhdid S. (2009). Activités antimicrobienne et antioxydante des huiles essentielles. Application biotechnologique pour l'amélioration de la qualité des boyaux naturels. Thèse pour l'obtention du doctorat en sciences. Université Abdelmalek Essaadi. Faculté des Sciences de Tétouan. Maroc.
- ❖ Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri Z., Baudoux D., Skali N. et Jamal Abrini S. (2006). *Thymus* essential oils : chemical composition and *in vitro* antioxydant and antibacterial activities. Congrès International de Bio - chimie. Agadir (Maroc), 09-12 Mai.
- ❖ Boukef, M. K. (1986). Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne. Paris : Agence de coopération culturelle et technique. 320 p.
- ❖ Bourgeois C. M. et Larpent J. P. (1996). Microbiologie alimentaire : Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 432-704
- ❖ Bourgeois C. M. et Larpent J.-P. (1996). Microbiologie alimentaire T2. Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Ed. Tec & Doc: 523p.
- ❖ Bouzabata A., Cabral C., Gonçalves M. J., Cruz M. T., Bighelli A. et Cavaleiro C. (2015). *Myrtus communis* L. as source of a bioactive and safe essential oil. *Food Chem. Toxicol.* 75:166-72.
- ❖ Bouzabata A., Faffani B., Casanova J. et Lélis T. (2010). Composition and chemical variability of Leaf Oil of *Myrtus communis* from North-Eastern Algeria. *Natural product communication*, Vol.5, No.10, 1659-1662.
- ❖ Bracquart P. et Lorient D. (1977). Effets des acides aminés sur la croissance de *Streptococcus thermophilus*. *Milchwissenschaft*, 32, 221-224.
- ❖ Bracquart P. et Lorient D. (1979). Effet des acides aminés sur la croissance de *Streptococcus thermophilus*. III. Peptides comportant Glu, His et Met. *Milchwissenschaft*, 34, 676-679.
- ❖ Bracquart P., Lorient D. et Alais C. (1978). Effet des acides aminés sur la croissance de *Streptococcus thermophilus*. II. Etude sur cinq souches. *Milchwissenschaft*, 33, 341-344.

- ❖ Brada M., Tabti N., Boutoumi H., Wathelet J. P. et Lognay G. (2012). Composition of the essential oil of leaves and berries of Algerian myrtle (*Myrtus communis* L.). Journal of Essential Oil Research, 24:1, 1-3.
- ❖ Brada M., Tabti N., Boutoumi H., Wathelet J. P., et Lognay G. (2012). Composition of the essential oil of leaves and berries of Algerian myrtle (*Myrtus communis*.L). Journal of essential oil Research, Vol. 24, No. 1, 1-3.
- ❖ Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3e édition revue, Tec & Doc Lavoisier, Paris.
- ❖ Bulut G. et Tuzlaci E. (2013). An ethnobotanical study of medicinal plants in Turgutlu. Manisa, Turkey. Journal of Ethnopharmacology 149, p633–647.
- ❖ Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International Journal of Food Microbiology, 94, 223-253.

C:

- ❖ Cannas S., Molicotti P., Ruggeri M., Cubeddu M., Sanguinetti M., Marongiu B. et Zanetti S. (2013). Antimycotic activity of *Myrtus communis* L. towards *Candida* spp. from clinical isolates. J Infect Dev Ctries , 7(3) , p295–298.
- ❖ Carrée P. (1953). Précis de technologie et de chimie industrielle. Tome II. Ed. Ballière J. B. et fils. 432 pages.
- ❖ Chalchat J., Garry R. P. et Michet A. (1998). Essential oils of myrtle of the mediterranean littoral. J Essent Oil Res, 10, 613-617.
- ❖ Cholet O. (2006). Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecole Doctorale ABIES. UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires INRA, INA.16.
- ❖ Cholet O. (2006). Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. Institut National Agronomique Paris-Grignon. Ecole Doctorale ABIES. UMR de Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires INRA, INA.16.
- ❖ Clark S. et Plotka V.C. (2004). Yoghurt and sour cream: operational procedures and processing equipment. In: Handbook of food and beverage fermentation technology (Taylor C.R.C. et Francis G.,) New York, USA.
- ❖ Clark S. et Plotka V.C. (2004). Yoghurt and sour cream: operational procedures and processing equipment. In: Handbook of food and beverage fermentation technology (Taylor C.R.C. et Francis G.,) New York, USA.

- ❖ Cogan T. M. O'Dowd M., Mellerick D. 1981. Effects of pH and sugar on acetoin production from citrate by *Leuconostoc lactis*. Appl. Environ. Microbiol., 41, 1-8.
- ❖ Couplan F. (2009). Le régal végétal : Plantes sauvages comestibles. Edition sang de la terre. 189 p.
- ❖ Courtin P. et Rul F. (2004). Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. Lait, 84, 125-134.
- ❖ Courtin P., Monnet V. et Rul F. (2002). Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus/Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. Microbiology, 148, 3413-3421.
- ❖ Couverchel F-J. (1839). Traité des fruits tant indigènes qu'exotiques, ou dictionnaire carpologique. Paris, ville de Lyon: Imprimerie et librairie de Bouchard Huzard. 619 p.
- ❖ Cowan M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews, 12(4), 564- 582.
- ❖ Curini M., Bianchi A., Epifano F., Bruni R., Torta L. et Zambonelli A. (2003). Composition and *in vitro* antifungal activity of essential oils of *Erigeron canadensis* and *Myrtus communis* from France. Chem Nat Compd, 39 (2), p191-194.

D:

- ❖ Dave R. I. et Shah N.P., 1997. Effectiveness of ascorbic acid as an oxygen scavenger in improving viability of probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. International Dairy Journal, 7, 435-443.
- ❖ Dave R.I. et Shah N.P., 1997. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. International Dairy Journal, 17, 31-41.
- ❖ De feo V., De Simone F. et Senatore F. (2002). Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. Phytochemistry, 61, 573-578.
- ❖ De Man J.C., Rogosa M. et Sharpe M.E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. J. App. Bacteriol., 23, (1): 130-135.
- ❖ De Vuyst L. et Tsakalidou E. (2008). *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations. International Dairy Journal, 18, 476 - 485.
- ❖ Deriu A., Branca G., Mollicotti P., Pintore G., Chessa M., Tirillini B., Paglietti B., Mura A., Sechi L.-A., Fadda G. et Zanetti S. (2007). *In vitro* activity of essential oil of

Myrtus communis L. against *Helicobacter pylori*. Int J Antimicrob Agents ,30(6), p562–3.

- ❖ Desmazeaud M. (1983a). Comment les bactéries lactiques se comportent-elles dans le lait? Techn. lait., (976), 11-18.
- ❖ Desmazeaud M. et Devoyod J.-J. (1970). Action stimulante des microcoques caséolytiques sur les bactéries lactiques thermophiles. Mise en évidence de la nature peptidique des substances stimulantes. Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys., 10, 413-430.
- ❖ Desmazeaud M. et Hermier J. (1972). Isolement et détermination de la composition qualitative des peptides issus de la caséine, stimulant la croissance de *Streptococcus thermophilus*. Eur. J. Biochem., 28, 190-198.
- ❖ Desmazeaud M. et Hermier J. (1972). Isolement et détermination de la composition qualitative des peptides issus de la caséine, stimulant la croissance de *Streptococcus thermophilus*. Eur. J. Biochem., 28, 190-198.
- ❖ Donkor O. N., Henriksson A., Vasiljevic T. et Shaha N. P. (2007). Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and *in vitro* angiotensin converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. INRA, EDP Sciences. 86 : 21-38.
- ❖ Donkor O.N., Henriksson A., Vasiljevic T. et Shah N.P. (2006). Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. International Dairy Journal, 16, 1181- 1189.
- ❖ Donovan S. M., Shamir R. (2014). Introduction to the yogurt in nutrition initiative and the First Global Summit on the health effects of yogurt. Am J Clin Nutr, 99: 1209S-11S.
- ❖ Dortu C. et Thonart P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. Biotechnol. Agron. Soc. Env. 13(1) : 143-154.
- ❖ Drider D. et Prévost H. (2009). Bactéries lactiques: Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles. Ed. Economica Anthropos, Paris, France. pp 381- 427.
- ❖ Driessen F.M. Kingma F. et Stadhouders J. (1982). Evidence that *Lactobacillus bulgaricus* in yoghurt is stimulated by carbon dioxide produced by *Streptococcus thermophilus*. Neth Milk Dairy J., 36, 135-144.

E:

- ❖ El Haib A. (2011). Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques. Thèse en vue de l'obtention de Doctorat, spécialité : Chimie organique et catalyse. Université Toulouse III - Paul Sabatier, 158p.
- ❖ Ezzat N., EL Soda M., Desmazeaud M.J. ISMAIL A. 1982. Peptidehydrolases from the *Thermobacterium* group of lactobacilli. II. Physiological factors and enzyme production. *Milchwissenschaft*, 37, 666-668.

F:

- ❖ Faleiro M. L., Miguel M. G., Ladeiro F., Venancio F., Tavares R., Brito J. C., Figueiredo A. C., Barroso J.G. et Pedro L.G. (2002). Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in Applied Microbiology*, 36, 35-40.
- ❖ FAO. (1995). Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO : Alimentation et Nutrition n° 28. Food & Agriculture Org., Rome, Italie. 271 p.
- ❖ Frederickson A. G. 1977. Behaviour of mixed cultures of microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.*, 31, 63-87.

G:

- ❖ Galesloot E. et Hassing F. (1973). Further investigations concerning the consistency of yoghurt. *NIZO Mededelingen*, 7, 15-33.
- ❖ Galesloot T. E., Hassing F. et Veringa H.A. (1968). Symbiosis in yoghurt. 1. Stimulation of *Lactobacillus bulgaricus* by a factor produced by *Streptococcus thermophilus*. *Neth. Milk Dairy J.*, 22, 50-63.
- ❖ Galesloot T. E., Hassing F. et Veringa H.A. (1968). Symbiosis in yoghurt. 1. Stimulation of *Lactobacillus bulgaricus* by a factor produced by *Streptococcus thermophilus*. *Neth. Milk Dairy J.*, 22, 50-63.
- ❖ Gerrit S., Bart A. S. et Wim J. M. E. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS. Microbiol. Rev.* 29 : 591-610.

- ❖ Ghasemi P.A., Rahimmalek M., Malekpoor F. et Karimi A. (2011). Variation in antibacterial activity, thymol and carvacrol contents of wild populations of *Thymus daenensis* subsp. *daenensis* Celak. Plant Omics Journal, 4(4), 209-214.
- ❖ Goetz, P. et Ghedira, K. (2012). Phytothérapie anti-infectieuse. France, Paris: Springer-Verlag, pp. 313-318.
- ❖ Gravot, A. (2008). Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV. Université de Rennes 1 – L2.
- ❖ Guiraud J. P., (2003). Microbiologie alimentaire. Technique et ingénierie, Dunod, série Agro- alimentaire, Paris, 652 p
- ❖ Guiraud J.P. et Rosec J.P. (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR. 237- 251.
- ❖ Gündüz G-T., Gönül S. et Karapinar M. (2009). Efficacy of myrtle oil against *Salmonella typhimurium* on fresh produce. Int J Food Microbiol , 130(2) , p147-150.
- ❖ Gürdal B. et Kültür . (2013). An ethnobotanical study of medicinal plants in Marmaris. Mu la, Turkey. Journal of Ethnopharmacology 146, p113–126.
- ❖ Gürsoy A., Durlu-Özkaya F., Yildiz F. et Aslim B., 2010. Set Type Yoghurt Production by Exopolysaccharide Producing Turkish Origin Domestic Strains of *Streptococcus thermophilus* (W22) and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (B3). KafkasUniversitesiVeterinerFakultesiDergisi, 16, 81-86.

H :

- ❖ Hamdan I. Y., Kunsman J. E. et Deanne D. D. (1971). Acetaldehyde production by combined yoghurt cultures. J. Dairy Sci., 54, 1080-1082.
- ❖ Haque A., Richarson R.K. et Morris E.R. (2001). Effect of fermentation temperature on the rheology of set and stirred yogurt. Food Hydrocoloids, 15, 593-602.
- ❖ Hemme D.H., Schmal V., Auclair J. E. (1981). Effect of addition of extracts of thermophilic lactobacilli on acid production by *Streptococcus thermophilus* in milk. J. Dairy Res., 48, 139- 148.
- ❖ Hickey M. W. , Hillier A. J. et Jago G. R. (1983). Peptidase activities in lactobacilli. Aust. J. Dairy Technol., 38, 118-123.
- ❖ Higashio K., Kikuchi T. et Furuichi E. (1978). Symbiose entre *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* dans le yoghourt. XX^e Congr. Int. Lait, Paris, F, 522-523.

- ❖ Ho T. N. T., N. Tuan N., Deschamps A. et Caubet R. (2007). Isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product of Vietnam. Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology. 134-142.
- ❖ Huie C.W. (2002). A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 373, 23-30.
- ❖ Hyldgaard M., Mygind T. et Meyer R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. Frontiers in Microbiology, 3, 1-24.

I :

- ❖ IDF (1997). International Dairy Federation. Enumeration of characteristics microorganisms' colony counts at 37°C. Brussels (Belgium), pp. 98-130.
- ❖ Idoui T., Boudjerda J., Leghouchi E. et Karam N.E. (2009). Lactic acid bacteria from "Sheep's Dhan", a traditional butter from sheep's milk: Isolation, identification and major technological traits. Grasas Y Aceites, 60, 177-183.
- ❖ ISO 4833. (2003). Microbiologie. Directives générales pour le dénombrement des micro-organismes. Méthode par comptage des colonies obtenues à 30°C.

J :

- ❖ Jeantet R., Croguennec T., Mahaut M., Schuck P. et Brulé G. (2008). Les produits laitiers. 2^{ème} Edition, Tec et Doc, Lavoisier, Paris, France.
- ❖ Jeantet R., Croguennec T., Schuck P. et Brulé G. (2007). Science des aliments, Technologie des produits alimentaires Vol 2, Tec et Doc, Lavoisier, Paris, France.

K :

- ❖ Kailasapathy K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yogurt. LebensmittelWissenschaft und -Technologie, 39, 1221– 1227.
- ❖ Kanbe C. et Uchida K. (1985). Oxygen consumption by *Pediococcus halophilus*. Agric. Biol. Chem., 49, 2931-2937.

- ❖ Khani A. et Basavand F. (2012). Chemical composition and insecticidal activity of myrtle (*Myrtus communis* L.) essential oil against two stored-product pests. *J. Med. Plants By-products* 2:83-89.
- ❖ Kim SH, Oh S (2013). Fermented milk and yogurt. In milk and dairy products in human nutrition: production, composition and health. Editor(s): Young W. Park, George F.W. Haenlein, pp. 338-356.
- ❖ Konings W.N. Otto R., 1983. Energy transduction and solute transport in streptococci. *Antonie Van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol.*, 49, 247-257.
- ❖ Koroleva N. S. et Kondratenko M. S. (1982). Symbiotic starters *Streptococcus thermophilus* and *Lactobaeillus bulgaricus*. In XXI Int. Dairy Congr., Moscou, pp 146.
- ❖ Kumari A., Makeen K., Garg A.P., Marotta F., Gupta C. et Divya (2009). Effet of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCSUB202, on mode of action of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MTCC3038. *Int. J. Prob. Preb.* 4(3) : 1-6.

L :

- ❖ Labioui H., Elmoualdi L., El Yachoui M. et Ouhssine M. (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* 144 : 237-250.
- ❖ Lamontagne M. (2002). Produits laitiers fermentés. In Science et technologie du lait, transformation du lait (Vignola C. L.). 2^{ème} Edition, Lavoisier, Paris, France.
- ❖ Lankaputhra W. E. V., Shah N. P. et Britz M. L. (1996b). Survival of bitidobacteria during refrigerated storage in the presence of acid and hydrogen peroxide. *Milchwissenschaft*, 51, 65- 70.
- ❖ Larpent J.P., 1997. Microbiologie alimentaire, Techniques de laboratoire. Tech et Doc Lavoisier, Paris, France.1092 pages.
- ❖ Law B. A. et Kolstad J. (1983). Proteolytic systems in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49, 225-245.
- ❖ Leclerc H. Gaillard F. L. et Simonet M. (1994). Les grands groupes de bactéries. In : *Microbiologie générale : la bactérie et le monde microbien*. Doin. Paris. 445.
- ❖ Lee W.J. et Lucey J.A. (2010). Formation and Physical Properties of Yogurt. *Asian Australasian Journal of Animals Sciences*, 23, 1127 -1136.

- ❖ Leroy F. et De Vuyst L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Tre. Food Sci. Technol.* 15 : 67-78.
- ❖ Leto C., Tuttolomondo T., La Bella S. et Licata M. (2013). Ethnobotanical study in the Madonie Regional Park. Central Sicily, Italy. Medicinal use of wild shrub and herbaceous plant species. *Journal of Ethnopharmacology*, 146, p90–112.
- ❖ Liu C., Ang S. et Huang X. (2016). Meroterpenoids with new skeletons from *myrtus communis* and structure revision of Myrtucommulone K. *Org. Lett.* 18(16):4004-4007.
- ❖ Loones A. (1994). Lait fermentés par les bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques. Vol 2. (De Roissart, H. et Luquet, F. M.), Lorica, Paris, France.
- ❖ Luquet F.M et Corrieu G. (2005). Bactéries lactiques et probiotiques. Coll. Science et techniques agroalimentaires. Ed. Tech & doc. Lavoisier, Paris. 306p.
- ❖ Luquet F.-M. (1986). Lait et produits laitiers (vache, brebis, chèvre) T3: qualité, énergie et tables de composition). Ed .Technique et Documentation. Paris : pp 343-442.
- ❖ Luquet F.M. et Corrieu G., 2005. Bactéries lactiques et probiotiques. Tec et Doc, Lavoisier, Paris, France.
- ❖ Lv F., Liang H., Yuan Q. and Li C. (2011). *In vitro* antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Research International*, 44, 3057-3064

M:

- ❖ Mahaut M., Jeantet R., Brulé G. et Schuck P. (2000). Les produits industriels laitiers. Tec et Doc, Lavoisier, Paris. France. 178p.
- ❖ Mahaut, M, Jeantet. R, Brulé G. et Schuck P (2000). Les produits industriels laitiers. *Techniques et documentation*. Lavoisier (Ed), Paris. 26-40.
- ❖ Mahboubi M. et Ghazian Bidgoli F. (2010). *In vitro* synergistic efficacy of combination of amphotericin B with *Myrtus communis* essential oil against clinical isolates of *Candida albicans*. *Phytomedicine*, 17, p771-774.
- ❖ Marrouf G. Tremblin, Abrégé de biochimie appliquée, EDP sciences 2009.
- ❖ Marshall M. E. et Law B. A. (1984). The physiology and growth of dairy lactic acid bacteria. In: Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk, Davies F. L. and Law B. A. (ed.), Elsevier Applied Science Publishers, Londres, 67-98.

- ❖ Marty-Teyesset C., De la Torre F. et Garel J.-R. (2000). Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbruekii* spp *bulgaricus* upon aeration: involvement of an NADH Oxidase in Oxidative Stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 262- 267.
- ❖ Mäyrä-Mäkinen A. et Bigret M. (2004). Industrial use and production of lactic acid bacteria. In : *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects* (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A.). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York. 73-102.
- ❖ Merghem R. (2009). *Eléments de biochimie végétale*, 171 pages, Bahaeddine éditions.
- ❖ Miller J. et Kandler O. (1967). Eiweissabbau und Anreicherung freier Aminosäuren durch Milchsäurebakterien in Milch. II. Die Anreicherung freier Aminosäuren durch Thermobakterien. *Milchwissenschaft*, 22, 469-480.
- ❖ Miller J. et Kandler O. (1967). Eiweissabbau und Anreicherung freier Aminosäuren durch Milchsäurebakterien in Milch. II. Die Anreicherung freier Aminosäuren durch Thermobakterien. *Milchwissenschaft*, 22, 469-480.
- ❖ Monnet V., Latrille E., Béal C. et Corrieu G. (2008). Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In : *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 512-592.
- ❖ Moon N. J. et Reinbold G. W. (1976). Commensalism and competition in mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *J. Milk Food Technol.*, 39, 337-341.
- ❖ Mulas M., Francesconi A. H. D. et Perinu B. (2002b). Myrtle (*Myrtus communis* L.) as a new aromatic crop: cultivar selection. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 9, 127–131.
- ❖ Mulas M., Francesconi A. H. D., Perinu B. et Fadda A. (2002a). ‘Barbara’ and ‘Daniela’: Two cultivars for myrtle berries production. *Acta Horticulturae*, 576, 169-175.

N :

- ❖ Nassar M.-I., Aboutabl E.-A., Ahmed R.-F., El-Khrisy E.-A., Ibrahim K.-M. et Sleem A.-A. (2010). Secondary metabolites and bioactivities of *Myrtus communis*. *Pharmacognosy Res*, 2(6) , p325–329.

- ❖ Nes I.F., and Skjelkvale R. (1982). Effect of natural spices and oleoresins on *Lactobacillus plantarum* in the fermentation of dry sausage. *J. Food Sci.* 47, 1618-1625.
- ❖ Novel G. (1993). Les bactéries lactiques in *Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel*. Leveau, J.Y, Bouix, M., Tech. Et Doc. Lavoisier Paris, pp: 170-374.

O :

- ❖ Ogunbanwo S. T., Sanni A. I., et Onilude A. A. (2003). Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African. J. Biotechnol.* 2(8) : 219-227.
- ❖ Olivera M., Caric M., Bozanic R. et Tratnik L. (1996).The influence of whey protein concentrates on the viscosity of yogurt, acidophilus and acidophilus yogurt. *Mljekarstvo*, 46, 91-100.
- ❖ Ott A., Germond J.E et Chaintreau A. (2000). Origin of acetaldehyde during milk fermentation using ¹³C-labeled precursors. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 1512-1517.
- ❖ Oulia P., Saderi H., Aghaei H., Yaraei R. et Zaeri F. (2007). The effect of *Myrtus communis* L. essential oil on treatment of Herpes simplex infection in animal model. *Iran J Med Arom Plants*, 23, p157-165.
- ❖ Özer B. et Atasoy F. (2002). Effects of addition of amino acids, treatment with β -galactosidase and use of heat-shocked cultures on the acetaldehyde level in yoghurt. *International Journal Dairy Technology*, 55, 166-170.

P:

- ❖ Paci Kora, E. (2004). Interactions physico-chimiques et sensorielles dans le yaourt brassé aromatisé : quels impacts respectifs sur la perception de la texture et de la flaveur ? Thèse de doctorat de l'Institut National Agronomique de Paris-Grignon, Sciences des Aliments, 258p.
- ❖ Panesar P.S., Kennedy J.F., Gandhi D.N. et Bunko K. (2007). Bioutilization of whey for lactic acid production. *Food chemistry*, 105, 1-14.
- ❖ Pette J. W. et Lolkema H. (1950). Symbiosis and antibiosis in mixed cultures of *Lb.bulgaricus* and *St.thermophilus*. *Nether land Milk and dairy journal*, 4: 197-208.

- ❖ Pette J.W., Lolkema H., 1950a. Yoghurt. 1. Symbiose en antibiose in mengcultures van *Lb. bulgaricus* en *Sc. thermophilus*. Neth. Milk Dairy J., 4, 199-208.
- ❖ Pilet M.F., Magras C. et Federighi M., 2005. Bactéries lactiques. In : Bactériologie alimentaire (Federighi M.). 2e Ed., Economica. Paris. 219-240
- ❖ Poulain. (1994). Évaluation de la préparation commerciale des ferments lactiques in Les bactéries lactiques T1. Aspects fondamentaux et technologiques. Ed. Loriga. Lavoisier, Paris, France. 604 p.
- ❖ Poznanski S., Surazynski A., O'Obyrn T. (1968). Activité de fermentation et de protéolyse de certaines souches de bactéries lactiques en présence d'acides gras. Lait, 48, 261-274.

Q :

- ❖ Quezel, P et Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionale. Tome II Edition. CNRS. Paris. P 636- 637.

R :

- ❖ Radke-Mitchell L. et Sandine W.E. (1984). Associative growth and differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. J. Food Prot., 47, 245-248.
- ❖ Radke-Mitchell L. et Sandine W.E. (1984). Associative growth and differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. J. Food Prot., 47, 245-248.
- ❖ Rasooli I. (2007). Food Preservation - A Biopreservative Approach. Food, 1(2), 111-136.
- ❖ Raynaud S. (2006). Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'autoacidification chez *Lactococcus lactis*. Thèse de Doctorat, Spécialité : Sciences Écologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries. Université Paul Sabatier, Toulouse, N° d'ordre : 826 : 309 p.
- ❖ Reiter B. et Oram J.O. (1962). Nutritional studies on cheese starters. 1. Vitamin and amino acid requirements of single strain starters J. Dairy Res., 29, 63-77.
- ❖ REITER B., 1978. Bacterial inhibitors in milk and other biological secretions, with special reference to the complement/ antibody, transferrin/lactoferrin, and lactoperoxidase/ thiocyanate/hydrogen peroxide systems. In

: Streptococei, Skinner F.A., et Quesnel L.B., ed., Academie Press Inc., Londres, 31-60.

- ❖ Rodrigues V. M., Paulo T. V. R., Marques M. O. M., Petenate A. J. et Meireles M. A. A. (2003). Supercritical Extraction of Essential Oil from Aniseed (*Pimpinella anisum* L) Using CO₂. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 51(6), 518-1523.
- ❖ Rodríguez E., Arqués J.L., Rodríguez R., Nuñez M. et Medina M. (2003). Reuterin production by lactobacilli isolated from pig faeces and evaluation of probiotic traits. Letters in Applied Microbiology, 37, 259-263.
- ❖ Rodriguez J. M., Martínez M. I., Horn N. et Dodd H. M. (2003). Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 80 : 101-116.
- ❖ Romdhane, M. (1993). *Extraction solide-liquide sous ultrasons- Mise en œuvre d'un capteur de puissance locale ultrasonore* (Doctoral dissertation).
- ❖ Rossi A., Di Paola R., Mazzon E., Genovese T., Caminiti R., Bramanti P., Pergola C., Koeberle A., Werz O., Sautebin L. et Cuzzocrea S. (2009). Myrtucommulone from *Myrtus communis* exhibits potent anti-inflammatory effectiveness *in vivo*. J Pharmacol Exp Ther , 329, p76-86.
- ❖ Rossi P.G., Berti L., Panighi J., Luciani A., Maury J., Muselli A., Serra D. de R., Gonny M. et Bolla, J.-M. (2007). Antibacterial Action of Essential Oils from Corsica. Journal of Essential Oil Research, 19, 176-182.
- ❖ Roudj S., Belkheir K., Zadi-Karam H. et Karam N. E. (2009). Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du Sud Ouest Algérien. European. J. Sci. Res. 34 (2) : 218-227.
- ❖ Roussel Y., Pebay M., Guedon G., Simonet J. M. et Decarissn B. (1994). Physical and genetic map of *Streptococcus thermophilus* A054. Journal of Bacteriology, 176, 7413-7422.

S:

- ❖ Saloff-Coste C. J. (1994). Lactic acid bacteria. Ed. World newsletter Danone, n°5, pp. 2-6.
- ❖ Sargin S., Akçicek E. et Selvi S. (2013). An ethnobotanical study of medicinal plants used by the local people of Ala ehir (Manisa) in Turkey. Journal of Ethnopharmacology 150, p860–874.

- ❖ Sarl T. (2007). La boutique en corse, les plantes adaptées aux jardins et espaces verts varois. France: régis rostein. Pp. 4-8.
- ❖ Schkoda P, Hechler A. et Hinrichs J. (2001), influence of the protein content on structural characteristics of stirred fermented milks. *Milchwissenschaft*, **56**, 19-22.
- ❖ Schleifer K.H. (1987). Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Letters*. 46 : 201-203.
- ❖ Schorsch C., Wilkins D.K., Jones M.J. et Norton I.T. (2001). Gelation of casein whey mixtures: effect of heating whey proteins alone or in the presence of casein micelles. *Journal of Dairy Research*, 68, 471-481.
- ❖ Serhan M., Cailliez-Grimal C., Borges F., Revol-Junelles A. M., Hosri C. et Fanni J. (2009). Bacterial diversity of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Food Microbiol*. 26 : 645-652.
- ❖ Shah N. P. (2003).Yogurt: The product and its manufacture. In: *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, Vol. 10, 2nd Edition (Caballero B, Trugo L. C. et Finglas P. M.), Academic Press, London, England
- ❖ Shakeel Hanif M., Zahoor1 T., Iqbal Z., Ihsan-ul-Haq. et Arif A.M. (2012). Effect of storage on rheological and sensory characteristics of cow and buffalo milk yogurt. *Pakistan Journal of Food Sciences*, 22, 61-70.
- ❖ Shankar P. A. et Davies F. L. (1977a). Amino acid and peptide utilization by *Streptococcus thermophilus* in relation to yoghurt manufacture. *J. Appl. Bacteriol.*, 43, 8-25.
- ❖ Shankar P. A. et Davies F. L. (1977b). Associative growth in yoghurt starters; initial observations on stimulatory factors. *J. Soc. Dairy Technol.*, 30, 31-32.
- ❖ Shekar S. et Bhat G.S. (1983). Influence of dissolved oxygen on acid production in buffalo milk by lactic cultures. *J. Food Prot.*, 46, 321-324.
- ❖ Sodini I., Remeuf F., Haddad S. et Corrieu G. (2004). The relative effect of milk base, starter, and process on yogurt texture: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44,113-137.
- ❖ Solórzano-Santos F. et Miranda-Novales M.G. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 136-141.
- ❖ Soltis, D ., Smith, S. A., Cellinese, N., Wirdack, K. J., Tank, D. C., Brockington, S. F., et al. (2011). Angiosperm phylogeny: 17 genes, 640 taxa. *American Journal of Botany*, 98, 704-730

- ❖ Sondi I., Remenf F., Haddad S. et Corrieu G. (2004). The relative effect of milk base, starter and process on yogurt texture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 113-137.
- ❖ Stiles M.E. et Holzapel W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36 : 1-29.
- ❖ Stiles M.E. et Holzapel W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36 : 1-29.
- ❖ Streit F., Corrieu G. et Béal C. (2007). Acidification improves cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CF11. *J. Biotechnol.* 128 : 659-667.
- ❖ Sumbul, S., Aftab Ahmad, M., Asif, M. et Akhtar, M. (2011). *Myrtus communis* Linn. - A review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 2, 395-402.
- ❖ Sun W. et Griffiths M.W. (2000). Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 17-25.
- ❖ Sutra L., Federighi M. et Jouve J.-L. (1998). *Manuel de bactériologie alimentaire*, Polytechnica. Paris : 308p.
- ❖ Svoboda K. P. et Hampson J. B. (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperature aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. *Proceedings NAHA*, 25-28 September, St. Louis Missouri, USA 105-127.

T:

- ❖ Tahraoui A., El-Hilaly J., Israili Z. H. et Lyoussi B. (2007). Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco, Errachidia province. *Journal of Ethnopharmacology* 110, p105–117.
- ❖ Tamime A. Y. et Robinson R. K. (1999). *Yogurt: science and technology*, 2^{ème} Edition, Cambridge, Woodhead Publishing, England. 619p.
- ❖ Tamime A.Y. et Robinson R.K. (2007). *Tamime and Robinson's Yoghurt, Science and Technology*, 3rd Edition. Cambridge Woodhead Publishing, England. p808.
- ❖ Tassou C., Drosinos E.H. et Nychas G.J.E. (1995). Effects of essential essential oil from mint (*Menthapiperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 C and 10 C. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 593-600.

- ❖ Terzaghi B.E. et Sandine W.E. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.*, 29: 807-813.
- ❖ Thevenard B. (2011). Implication des systèmes à deux composants dans les réponses de *Streptococcus thermophilus* à des changements environnementaux, dont la coculture avec *Lactobacillus bulgaricus*. Thèse de doctorat, Sciences agricoles. AgroParisTech, Spécialité : Microbiologie, 132p.
- ❖ Thevenard B. (2011). Implication des systèmes à deux composants dans les réponses de *Streptococcus thermophilus* à des changements environnementaux, dont la coculture avec *Lactobacillus bulgaricus*. Thèse de doctorat, Sciences agricoles. AgroParisTech, Spécialité : Microbiologie, 132p.
- ❖ Thomas T. D. et Mills O. E. (1981). Proteolytic enzymes of starter bacteria. *Neth. Milk Dairy J.*, 35, 255-273.
- ❖ Thompson J. et Gentry-Weeks C.R., 1994. Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques (De Roissart H. et Luquet F.M.). Loriga, Uriage. 1 : 239-290.
- ❖ Tinson W., Broome M.C., Hillier A.J. et Jago G.R. (1982). Metabolism of *Streptococcus thermophilus*. II. Production of CO₂ and NH₃ from urea. *Aust. J. Dairy Technol.*, 37 Farrow J.A.E. et Collins M.D. (1984). DNA base composition, DNA-DNA homology and long chain fatty acid studies on *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *J. Gen. Microbiol.*, 130, 357-362.
- ❖ Tiwari B.K., Valdramidis V.P., O'Donnell C., Muthukumarappan K., Bourke P. et Cullen P.J. (2009). Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 5987-6000.
- ❖ Tiwari I. C. P. and Pandey A. (1981). Effect of some essential oils on lactic acid bacteria. *J. Sci. Res.(Bhopal)* 3, 161-163.
- ❖ Uehleke H. et Brinkschulte-Freitas M. (1979). Oral toxicity of an essential oil from myrtle and adaptive liver stimulation. *Toxicol* , 12, p335-342.

U:

- ❖ Ustunol Z. et Gandhi H. (2001). Growth and viability of commercial *Bifidobacterium* spp. in honey-sweetened skim milk. *Journal of Food Protection*, 64, 1775-1779.

V:

- ❖ Vaillancourt K., Bedard N., Bart C., Robitaille M. T. G., Turgeon N. et Frenette M. (2008). Role of galK and galM in galactose metabolism by *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 1264–1267.
- ❖ Veringa H .A., Galesloot T. E. et Davelaar H. (1968). Symbiosis in yoghurt. II. Isolation and identification of a growth factor for *Lactobacillus bulgaricus* produced by *Streptococcus thermophilus*. *Neth. Milk Dairy* 1., 22, 114-120.
- ❖ Veringa H .A., Galesloot T. E. et Davelaar H. (1968). Symbiosis in yoghurt. II. Isolation and identification of a growth factor for *Lactobacillus bulgaricus* produced by *Streptococcus thermophilus*. *Neth. Milk Dairy* 1., 22, 114-120.
- ❖ Vierling E. (2008). *Aliments et boissons : filières et produits*, 3^{ème} Edition, Doin ,Welters Kluwer, France
- ❖ Vivek K., Bajpai A., Kwang-HyunBaek A. et Sun Chul Kang B. (2012). Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. Dans : *Food Research International*, 45, Issue 2, pp. 722-734.

W:

- ❖ Walstra P., Woulters J.T.M. et Geurts T.J. (2006). Milk components. In: *Dairy science and Technology* (Taylor C.R.C. ET Francis G.), Florida, USA.

Y:

- ❖ Yadegarinia D., Gachkar L., Bagher Rezaei M., Taghizadeh M., Astaneh S.A. et Rasooli I. (2006). Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry*, 67, 1249-1255.
- ❖ Yoshimura M., Amakura Y., Tokuhara M. et Yoshida T. (2008). Polyphenolic compounds isolated from the leaves of *Myrtus communis*. *J. Natural Med.* 62:366-368.

Z:

- ❖ Zanetti S., Cannas S., Molicotti P., Bua A., Cubeddu M., Porcedda S., Marongiu B. et Sechi L.-A. (2010). Evaluation of the antimicrobial properties of the essential oil of *Myrtus communis* L. against clinical strains of *Mycobacterium* spp. *Interdisc Perspect Infect Dis*, p1-4.

- ❖ Ziyyat A., Legssyer A., Mekhfi H., Dassouli A., Serhrouchni M. et Benjelloun W. (1997). Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *Journal of Ethnopharmacology*, 58, p45–54.
- ❖ Zomorodian K., Moein M., Lori Z. G., Ghasemi Y., Rahimi M. J., Bandegani A., Pakshir K., Bazargani A., Mirzamohammadi S. et Abbasi N. (2013). Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oil from *Myrtus communis* Leaves. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16:1, 76-84.