

République Algérienne Démocratique et Populaire

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



جامعة عبد الحميد ابن باديس

مستغانم
كلية العلوم الطبيعية و الحياة

DEPARTEMENT D'AGRONOMIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Mlle BENZINEB Zoulikha

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN AGRONOMIE

Spécialité CONTRÔLE DE QUALITÉ DES ALIMENTS

THÈME

Effets antimicrobiens des extraits de Romarin (*Rosmarinus officinalis*) sur les qualités physico-chimiques et microbiologiques d'un lait fermenté type yaourt.

Soutenue publiquement le : 07/07 /2019

Devant le Jury :

- | | | |
|---|-----|----------------|
| ✓ Président : M.BENMILOUD. DJ | MCA | U.Mostaganem. |
| ✓ Encadreur : M. BEKADA .A | PR | U.Tessimisslt. |
| ✓ Examinatrice : M ^{me} BENMAHDI.F | MCA | U.Mostaganem. |

Thème réalisé au Laboratoire de recherche microbiologie et in vitro de U.Mostaganem

Année universitaire 2018 / 2019.

Remerciement

Avant toute chose, on tient à remercier Dieu, le tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience d'achever ce modeste travail.

On exprime aussi nos profonds remerciements à M. BEKADA, A d'avoir accepté de nous encadrer ; ses conseils, orientations et corrections précieuses ont été très profitables pour nous.

On adresse éventuellement nos sincères remerciements à M. BENMILLOU Dj, d'avoir d'accepté de présider le jury de soutenance.

On exprime également notre gratitude à M^{me} BENMAHDI F, d'avoir accepté d'examiner.

Mes remerciements vont également à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail monsieur ABAYDI responsable des laboratoires, et le groupe de bibliothèque de SNV monsieur el hadj en particulier les techniciens du laboratoire; M.

MOHAMMED, M. DJILALI, M. REDOUANE, M.

SOUANE, M^{me} JAMALYA, et de l'université de Mostaganem.

Dédicace

Je tiens d'abord à remercier le dieu ALLAH le tout puissant, pour le courage, la santé, l'amour du savoir et la patience qui m'a donné pour réaliser ce modeste travail que je dédie:

A ma très chère mère KHEIRA:

En témoignage de mon affection et de ma profonde reconnaissance et Pour votre soutien inestimable

A mon père LARBI :

Je prie Dieu le tout Puissant, le Clément et le Miséricordieux pour que vos âmes reposent en paix!

A mes frères et mes sœurs et cousines :

Fatma, Aicha, Malika, Fatima, Mohamed .Nawel. Je vous dis merci pour la complicité et aussi pour les conseils.

A toute la famille de BENZINEB et LEKHAL

A mes amis (es)

Pour le soutien moral et les moments agréables passés avec
VOUS

A: sehila, Houda, Meryem ,Kheira ,khaldiya , Yacine,Omar.

Et A tous les enseignants d'agronomie et mes collègues de la promotion de master 2 contrôle de qualité des aliments 2018/2019.

Résumé

Cette étude contribue à la détermination des effets de l'extrait hydro méthanolique obtenu à partir des parties aériennes d'une plante aromatique récolté dans la région de RELIZANE à savoir le *Rosmarinus officinalis* sur la qualité physicochimique, microbiologique et d'un lait fermenté type (yaourt ferme).

L'expérimentation a été réalisée avec des taux d'incorporation de romarin à 0, 2, 4 et 6% respectivement dans les laits fermentés étuvés. Chaque paramètre «étudié est représenté par trois pots de 100 ml ; soit un nombre totale de 9 échantillons expérimentaux. Durant la période de fermentation et de post acidification dans 21 jours de conservation les mesures et contrôles suivant ont été effectués tous les 7 jours sur chaque produit transformé : physicochimique (pH, acidité Dornic et viscosité), ainsi que microbiologique (dénombrement des germes spécifique de yaourt).

L'ajout d'extrait hydro-méthanolique de *Rosmarinus officinalis* à des doses sévères de 4 à plus de 6 % a modifié relativement la qualité physicochimique, microbiologique et des laits fermentés par comparaison au témoin.

Il s'avère possible d'incorporer les extraits hydro-alcooliques de romarin jusqu'à un taux de 4 %.

Mots clés : *Rosmarinus officinalis*, extrait méthanolique, yaourt, qualité.

Abstract

This study contributes to the determination of the effects of the hydro methanolic extract obtained from the aerial parts of an aromatic plant harvested in the RELIZANE region namely *Rosmarinus officinalis* on the physicochemical, microbiological quality and a typical fermented milk (firm yoghurt).

The experiment was carried out with rates of incorporation of rosemary at 0, 2, 4 and 6% respectively in steamed fermented milks. Each parameter "studied is to represent three pots of 100 ml; a total of 9 experimental samples. During the fermentation and post-acidification period in 21 days of storage, the following measurements and controls were carried out every 7 days on each transformed product: physicochemical (pH, Dornic acidity and viscosity), as well as microbiological (enumeration of specific germs). Yoghurt).

The addition of hydro-methanolic extract of *Rosmarinus officinalis* at severe doses of 4 to more than 6% altered the physicochemical, microbiological and fermented quality in comparison with the control.

It is possible to incorporate the hydro-alcoholic extracts of rosemary to a rate of 4%.

Key words: *Rosmarinus officinalis*, methanolic extract, yoghurt , quality.

Liste des abréviations

% : pourcentage

μ : viscosité dynamique

°C : Degré celsius

CO₂ : dioxyde de carbone **°D** : Degré Dornic .

FAO : Food Agriculture Organisation.

g : gramme.

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène.

H : heure.

HS : hautement significatif.

S : significatif.

Jr: jour.

L.b : *Lactobacillus bulgaricus*.

S.th : *Streptococcus thermophilus* .

L : litre.

mg : milligramme.

mg/l : milligramme par litre.

ml : millilitre.

MSNG : Matières sèche laitières non grasses.

N : Normalité.

NAOH : Hydroxyde de sodium.

NS : non significatif.

pH : potentiel hydrogène.

Liste des abréviations

S/L : rapport de souche *Streptococcus thermophilus* sur *Lactobacillus bulgaricus*.

T° : température optimale.

Vs : viscosité.

BL : Bactérie lactique.

UFC : Unité ferment colonie.

mn : Minute.

MRS : Gélose de Man-Rogosa-Sharpe.

M17: Mannitol.

°D: Degré Dornic.

Rdt : Rendement.

µg : microgramme.

Liste des figures

Figure .01 Morphologie électronique de souche <i>St. Thermophilus</i> (x100)	4
Figure.02 Morphologie électronique de souche <i>Lactococcus bulgaricus</i> (x100)	5
Figure 03. Interaction de <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Lactobacillus bulgaricus</i> en culture mixte dans le lait	7
Figure 04. Les bactéries lactiques du yaourt. (Vue microscopique)	8
Figure 05. Diagramme de fabrication des yaourts	10
Figure 06 : Photo de <i>Rosmarinus officinalis</i>	15
Figure 07 : photo représente les parties de la plante du <i>Rosmarinus officinalis</i>	17
Figure 08: structure des acides phénoliques dans le Romarin	20
Figure 09: structure de quelques diterpènes phénoliques du romarin	20
Figure 10 : Schéma représente la macération de la matière végétale.....	26
Figure 11 : Broyage de La plante du Romarin	28
Figure 12 : Evaporation par rotavapor	29
Figure 13. Diagramme d'extraction des composées bioactifs de <i>rosmarinus officinalis</i>	29
Figure 14 : Spectrophotomètre série 74	30
Figure 15 : Diagramme de fabrication de levain lactique	32
Figure 16 : Ferments lactiques <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Lactobacillusbulgaricus</i>	32
Figure17: Levain lactique.....	32
Figure18: Yaourt étuvé	33
Figure 19: Diagramme de fabrication yaourt étuvé	34
Figure20 : NaOH+phenophtaleine	35
Figure 21: Lait fermenté	35
Figure 22: L'appareil utilisé.....	35
Figure23 : pH- mètre	35

Figure24: Viscosimètre	36
Figure 25: Diagramme de dilution	37
Figure26: Ensemencement des boites de pétris	37
Figure 27 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.	39
Figure 28 : Evolution du pH des laits fermentés additionnés d'extraits à méthanol de romarin	40
Figure29 : Evolution de l'acidité des laits fermentés additionnés d'extraits de Romarin.....	42
Figure 30 : Evolution de la viscosité des laits fermentés additionnés d'extraits de Romarin.....	45
Figure 31 : Evolution du nombre de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> des laits fermentés additionnés d'extraits à méthanol de Romarin	45
Figure 32 : Evolution du nombre de <i>Streptococcus thermophilus</i> des laits fermentés additionnés d'extraits méthanol de Romarin.....	47

Liste des tableaux

Tableau 01 : Principaux caractères de <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	7
Tableau 02. Normes microbiologiques pour le yaourt.....	11
Tableau 03. Représente les problèmes de fabrication du yaourt.....	14
Tableau 04. Composition des éléments nutritifs de romarin séché.....	19
Tableau 05 : composition de l'huile essentielle de romarin	22
Tableau 06 : Représente la méthode de dosage des poly phénols totaux.....	30
Tableau 07 : Représente le rendement des poly phénols totaux	39
Tableau 08: Evolution du pH des laits fermentés additionnées d'extrait de Romarin.....	41
Tableau 09 : Evolution de l'acidité Dornic des laits fermentés additionnées d'extraits de Romarin	42
Tableau 10 : Variation de la viscosité des laits fermentés additionnées l'extraits de Romarin	44
Tableau 11 : Résultats de l'aspect macroscopique de <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	45
Tableau 12 : Evolution du nombre de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ($N.10^5$ UFC/ml) des laits fermentés additionnées d'extraits au méthanol de Romarin	46
Tableau 13 : Résultats de l'aspect macroscopique de <i>Streptococcus thermophilus</i>	47
Tableau 14 : Evolution du nombre de <i>Streptococcus thermophilus</i> ($N.10^5$ UFC/ml) des laits fermentés additionnées d'extraits de Romarin	48

Table des matières

Remercîment

Dédicace

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Partie I : Etude bibliographiques

Chapitre I : Généralité sur le yaourt

1-Historique	1
2-Définitions	1
3-Classification des différents types de yaourts	2
3-1 Selon la texture	2
3-2- Selon la teneur en matières grasses	2
3-3 Selon le goût	2
4. Les composants du yaourt	3
5. Les bactéries lactiques	4
5.1. Définition	4
5.2. Origine	4
5.3. Caractéristiques des bactéries du yaourt	4
5.3.1. <i>Streptococcus thermophilus</i>	4
5.3.2. <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	5

5.4. Intérêts et fonctions des bactéries du yaourt	5
5.4.1. Production d'acide lactique	5
5.4.2. Activité protéolytique	6
5.4.3. Activité texturant	6
5.5. Symbiose des souches	6
5.6. La sélection des bactéries lactiques du yaourt	7
6-1- Préparation de lait	8
6-2- Pasteurisation.....	8
6-3- Refroidissement	8
6-4- Ensemencement	9
6-5- Conditionnement	9
6-6- Incubation (fermentation)	9
6-7- Arrêt de fermentation	9
6-7- Conservation	9
7. Qualité du yaourt	10
7.1. Aspects physico-chimique	10
7.2. Aspects hygiéniques	10
7.3. Défauts et altérations du produit	11
7.4. Comportement rhéologique.....	11
8. Apports nutritionnels du yaourt	11
8.1. Apport modéré en énergie	12
8.2. Apport en minéraux et vitamines	12
9. Contaminations du yaourt	12

Chapitre II : Généralité sur le *Rosmarinus officinalis*

1. Généralités	15
2. Historique.....	15
3. Définitions	15
4. Appellations régionales en Algérie.....	16
5. Description botanique	16
6. position systématique de l'espèce <i>Rosmarinus officinalis</i>	16
7. Caractéristiques de la famille des Lamiacées	17
8. Répartition géographique	17
9. Récolte du Romarin	18
10. Saveur, arôme et valeur nutritive	19
11. Composition phénolique	19
12. Propriétés du <i>Romarin</i>	20
12.1. Activité antibactérienne	20
12.2. Activité anti-oxydante	21
13. Les huiles essentielles	21
13.1. Définition des huiles essentielles.....	21
13.2. Composition chimique de romarin L'huile essentielle du romarin	21
13.3. Facteurs influençant la composition	22
13.4. Toxicité des huiles essentielles	23
14. Chémotypes de romarin	23
15. Utilisations du romarin « <i>Rosmarinus officinalis</i> »	24
15.1. En alimentation	24
15.2. En Industrie agro-alimentaire	24
15.3 Autres utilisation	25
16. Extraction des composées phénoliques	25
16.1. Extractions par les solvants.....	25
16.2. Extraction par macération	25
16.3. Extraction méthanolique (EM)	26

Partie II : Etude expérimentale

Chapitre I : méthodologie

1. l'Objectifs	27
2. Matériel végétal	27
3. Extraction des composés bioactifs	27
4. Dosage des poly phénols totaux.....	29
4.1. Principe	29
4.2. Mode opératoire	30
4.3. Rendement des extraits	31
5. Essai de fabrication d'un lait fermenté alicament enrichi d'extraits de romarin	31
5.1. Protocole expérimental	31
5.2 Préparation des levains.....	31
5.3 Technologie de fabrication des laits fermentés expérimentaux	33
6. Mesures et contrôles.....	35
6.1 Paramètres physicochimiques.....	35
6.1.1 Acidité.....	35
6.1.2 pH.....	35
6.1.3 Viscosité dynamique.....	35
6.2 Analyses microbiologiques	36
6.2.1 Méthode d'analyses	36
7. Traitement statistique	38

Chapitre II : résultats & Discussion

I. Résultats

I.1 analyse biochimique	39
I.2 Analyses physico-chimiques	40
I.2.1. pH	40
I.2.2 L'acidité Dornic	41
I.2.3. Viscosité	43
I.3 Analyse microbiologique.....	44

I.3.1 <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	44
I.3.1 <i>Streptococcus thermophilus</i>	46
II. Discussion	49
Conclusion	
Références Bibliographique	
Annexes	

Introduction générale

Introduction

La plante est un organisme vivant qui existe depuis l'antiquité. Elle constitue un maillon très important et fondamental dans le cycle biologique de vie des autres organismes vivants tel que les animaux ainsi que les êtres humains. L'ensemble de ses organismes forme une usine productrice, des milliers de substances qui sont différentes sur le plan structurel ainsi que biologique.

Le yaourt est un écosystème naturel qui fait intervenir deux bactéries lactiques, il est défini comme un lait fermenté issu de la transformation du lait par deux bactéries spécifiques *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*. Il est l'un des produits laitiers le plus vendu sur le marché du fait de la diversification de la gamme disponible. En plus de son importance nutritionnelle, il a été identifié pendant longtemps en tant que nourriture saine due à l'action bénéfique de ses bactéries vivantes (**Tamime et Robinson, 2007**).

Le yaourt est l'un des produits préférés par le consommateur, en Algérie selon l'office national des statistiques, la consommation moyenne des algériens est de 8,5 Kg par personne par ans (**Kaci et Sassi, 2007**).

Avec l'évolution du consommateur vers la recherche d'un nouveau goût dans les aliments, néanmoins dépourvus d'additifs chimiques, la dynamique actuelle du marché des denrées alimentaires oblige les industrielles à formuler constamment de nouveau produit. Ainsi, l'intérêt des consommateurs est portée pour des produits allégés et bio qui devient aussi une des caractéristique de l'alimentation particulière dite de diététique moderne.

Les études qui ont été réalisées jusqu'à maintenant, montrent que les extraits des plantes médicinales peuvent être appliqués à tous les aliments. L'évaluation des propriétés antimicrobiennes des extraits demeure très importante pour les exploiter dans l'industrie comme étant des conservateurs naturels (**Guesmi et Bodarousse, 2006**).

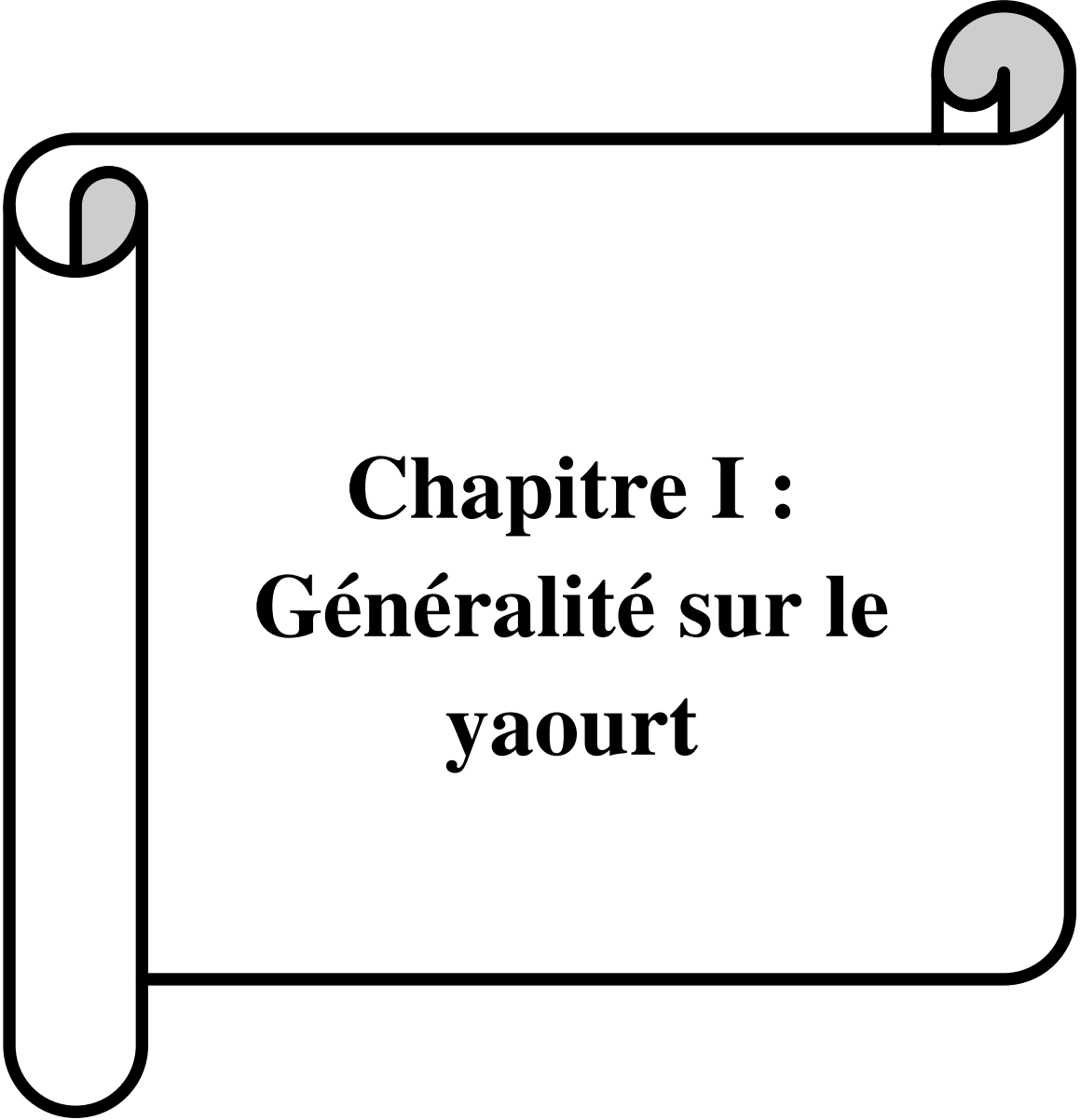
L'objectif de notre travail est d'étudier l'activité anti bactérienne de l'extrait obtenu par la macération de la plante *Rosmarinus officinalis* pour d'éventuelles utilisations comme agent naturel conservateur et aromatique dans le lait fermenté. L'industrie alimentaire utilise les composés phénoliques pour rehausser le goût, aromatiser et colorer les aliments (**Aprotosoie et al, 2010**). D'autre part, les huiles essentielles possèdent des profils de

Introduction générale

composition chimique différents permettant de les utiliser comme agents naturels de conservation des aliments (**Holley et al., 2005**).

Le but de cette étude est d'évaluer l'effet des composés poly phénoliques de *Rosmarinus officinalis* récolté dans la région de Relizane sur les qualités physico-chimiques et microbiologiques d'un lait fermenté de type yaourt étuvé.

**Partie I : Etude
bibliographique**



Chapitre I : Généralité sur le yaourt

1-Historique

Les laits fermentés sont préparés depuis une époque très lointaine en Asie centrale, dans les pays méditerranéens et dans la pluparts des régions d'élevage ou ils constituent un mode de protection et de conservation du lait grâce à l'abaissement du pH en même temps qu'ils sont un aliment apprécié pour sa saveur. Longtemps restés traditionnels, certains de ces produits connaissent depuis quelque années un développement considérable grâce d'une part, à l'intérêt qu'y trouvent les consommateurs sur le plan organoleptique, nutritionnel, voire thérapeutique et d'autre part, à la mise en œuvre de procédés de fabrication industriels et aux progrès de la distribution. Enfin, l'attrait pour ces produits est renforcé par leur diversification et par des puissantes campagnes publicitaires. Ces produits présentent un grand intérêt dans les pays en développement en raison de leur acidité qui en fait des aliments hygiéniques, sans inconvénients pour les consommateurs intolérants au lactose. De plus, ils présentent une bonne valeur nutritionnelle, des qualités organoleptiques généralement très bien acceptés ainsi qu'une relative facilité de préparation et de distribution (**Keddar et Koubich, 2009**).

2-Définitions

Le yoghourt ou le yaourt est un lait fermenté obtenu par la multiplication dans le lait de deux bactéries lactiques spécifiques associées : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. Ces bactéries lactiques sont cultivées sur du lait préalablement pasteurisé, dans le but d'éliminer la plus grande partie ou la totalité de la flore microbienne préexistante. Après la fermentation, le yaourt est refroidi à une température comprise entre 1 et 10°C, à l'exclusion de tout autre traitement thermique, il est alors prêt à être consommé » (**Luquet, 1990**).

Le mot yaourt (yoghourt ou yogourt) vient de « yoghurmark », mot turc signifiant « épaissir ». 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 (**Fredot, 2005 ; 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 (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-Classification des différents types de yaourts

3-1 Selon la texture : Selon la texture les yaourts sont classés comme suite :

Yaourts fermes : Ce sont les yaourts coagulés en pots, selon (Veisseyre ,1997) généralement des yaourts naturels ou aromatisés, dont la fermentation s'opère après la mise en pot à une température comprise entre 42 et 44°C dans le cas des yaourts sucrés, aromatisés, aux fruits, à la confiture, etc..... l'apport des additifs se fait avant ou après le remplissage des pots.(Keddar et Koubich, 2009).

Yaourts brassés : Ce sont les yaourts coagulés en cuve et brassés avant la mise en pot.

Yaourts à boire : C'est des yaourts dont la texture est liquide.

3-2- Selon la teneur en matières grasses : d'après la teneur en matière grasse les yaourts sont repartis en :

- **Yaourts maigres** : Les yaourts renferment des teneurs en matières grasses inférieures à 1%.
- **Yaourts ordinaires nature** : Les yaourts renferment des teneurs en matières grasses 1 % minimum.
- **Yaourts entiers** : Les yaourts renferment des teneurs en matières grasses 3,5 % (en pratique de 3 à 4,5%).

3-3 Selon le goût : selon le goût on retrouve

- **Yaourts sucrés** : ils sont additionnés de saccharose à un taux variable de %.
- **Yaourts aux fruits**, au miel, à la confiture : ils subissent une addition inférieure à 30 % de ces différents produits.
- **Yaourts aromatisés** : les produits contiennent des arômes naturels renforcés par un produit.

4. Les composants du yaourt

La principale matière première pour la fabrication des yaourts est le lait dont, pour l'essentiel, le lait de vache. Il est constitué d'environ 88% d'eau et de 12% de matière sèche totale contenant des glucides, des protéines, des lipides et des minéraux (**Tamime et Robinson, 1999**).

Cependant, la plupart des yaourts contiennent d'autres additifs tels que les matières sèches laitières non grasses (MSNG), pour augmenter le taux de matière sèche non gras du lait de 8.25% à 16% (**CFR131, 2000**). Les constituants non laitiers se composent des édulcorants, des stabilisateurs, des fruits et des colorants. Des édulcorants tels que le sirop de sucrose, de sucre inverti, de fructose, de glucose ou de galactose sont ajoutés principalement pour des préférences du goût (**Tamime et Robinson, 1999**).

Des stabilisateurs tels que les gommages naturelles, les gommages naturelles modifiées ou les gommages synthétiques sont ajoutés pour améliorer et maintenir la fermeté et l'uniformité de gel, et améliorent également la perception dans la bouche. Les stabilisateurs typiques de yaourt incluent la carboxy-méthyle cellulose (CMC), la gomme de guar, la gomme de xanthane, les carraghénanes ou les pectines (**Soukoulis et al, 2007**).

Les hydrocolloïdes stabilisent spécifiquement les structures de gel, augmentent la viscosité et forment un réseau avec les constituants de lait (**Teles et Flores, 2007**).

Les fruits dans les yaourts sont apportés sous formes de préparation des fruits avec ou sans sucre ajouté. Les agents de texture, incorporés dans la préparation de fruit, participent également à l'amélioration de la texture des yaourts. Les fruits les plus consommés sont les fruits rouges et les fruits exotiques (**Vignola, 2002**).

5. Les bactéries lactiques

5.1. Définition

Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans les procédés de fermentation permettant la conservation des produits alimentaires. Ces denrées bénéficient ainsi d'une meilleure aptitude à la conservation ; mais elles acquièrent aussi certaines de leurs propriétés, comme le goût et la texture, voir une action favorable sur la santé. La fermentation lactique est principalement le fait de quelques groupes des bactéries gram-positif dont principalement : *L. lactis*, *S. thermophilus*, et quelque espèces de *Lactobacilles* et de *Leuconostoc*. (François, 2008).

5.2. Origine

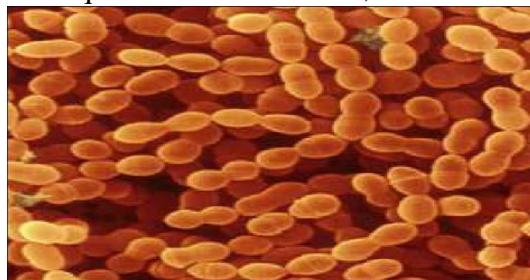
Les bactéries lactiques sont très abondantes dans la nature. Elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, des végétaux ou des alimentsensemencés par les végétaux. Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux (Leveau et Bouix, 1993).

5.3. Caractéristiques des bactéries du yaourt

5.3.1. *Streptococcus thermophilus*

St. thermophilus est une coque à Gram positif, non mobile. Elle est trouvée dans les laits fermentés et les fromages (Dellagio et al, 1994).

Le rôle principal de *St. thermophilus* est la fermentation du lactose du lait en acide lactique. En plus de son pouvoir acidifiant, elle est responsable de la texture dans les laits fermentés. Elle augmente la viscosité du lait par production de polysaccharides (composés de galactose, glucose ainsi que des petites quantités de rhamnose, arabinose et de mannose) (Bergamaier, 2002).



(Terre, 1986)

Figure .01 Morphologie électronique de souche *St. Thermophilus* (x1000).

5.3.2. *Lactobacillus bulgaricus*

Lb. bulgaricus est un bacille Gram positif, immobile. Il possède un métabolisme strictement fermentaire avec production exclusive de l'acide lactique comme principale produit finale.

Lb. bulgaricus est une bactérie thermophile, très exigeante en calcium et en magnésium et sa température optimale de croissance est d'environ de 42°C. Cette bactérie à un rôle essentiel dans le développement des qualités organoleptiques et hygiéniques du yaourt (**Marty-Teyssset et al, 2000**).

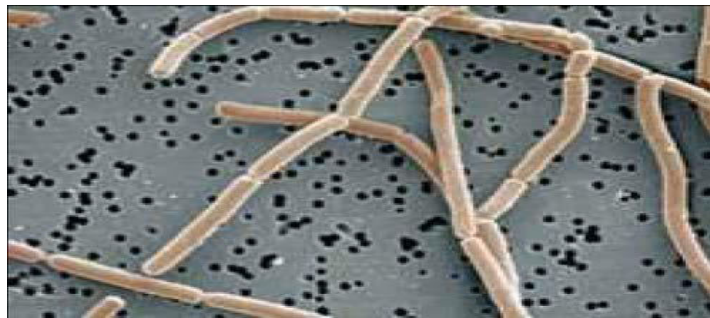


Figure.02 Morphologie électronique de souche *Lactobacillus bulgaricus* (x1000)

5.4. Intérêts et fonctions des bactéries du yaourt

5.4.1. Production d'acide lactique

La production d'acide lactique est une des principales fonctions des bactéries lactiques en technologie laitière, car cet acide organique permet de concentrer et de conserver la matière sèche du lait, en intervenant comme coagulant et antimicrobien. Le métabolisme est de type homo-fermentaire (production exclusif de l'acide lactique).

L'importance de l'acide lactique durant la fabrication du yaourt peut se résumer comme suit :

- Il aide à déstabiliser les micelles de caséines, ce qui conduit à la formation du gel.
- Il donne au yaourt son goût distinct et caractéristique, comme il contribue à la saveur et l'aromatisation du yaourt.
- Intervient comme inhibiteur vis-à-vis des micro-organismes indésirables (**Schmidt et al, 1994**).

5.4.2. Activité protéolytique

Les bactéries lactiques sont dotées de pouvoirs protéolytiques complexes par leur nature et leur location, car pour satisfaire leur besoin en acides aminés, elles doivent dégrader les protéines.

Elles possèdent des endopeptidases liées aux parois qui peuvent parfois être de type acide ou neutre. Des exopeptidases sont également associées aux enveloppes cellulaires.

Le niveau de ces activités protéolytiques peut varier en fonction de certain nombre des facteurs physico-chimique ou génétiques .La température de croissance et le pH du milieu sont également des facteurs qui peuvent affecter le niveau de production d'enzymes (**Vignola, 2002**).

5.4.3. Activité texturant

La texture et l'onctuosité constituent, pour le consommateur, d'importants éléments d'appréciations de la qualité du yaourt. Certaines souches bactériennes produisent, à partir du glucose, des polysaccharides qui en formant des filaments, limitent l'altération du gel par les traitements mécaniques et contribuent à la viscosité du yaourt. L'augmentation de la viscosité du yaourt est en général attribuée à la production d'exopolysaccharide (**Schmidt et al, 1994**).

5.5. Symbiose des souches

Les deux espèces, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* sont des micro-aérophiles et vivent ensemble en symbiose dans le yaourt en produisant d'avantage d'acide lactique.

Pour ce développe, ces bactéries ont besoins d'acides aminés et des peptides. Or, le lait n'en contient que de faible quantité permettant seulement d'assurer le démarrage de leur croissance. Sauf que le *Lactobacillus bulgaricus* par son activité protéolytique, attaque les caséines du lait en libérant les peptides permettant au *Streptococcus thermophilus* de poursuivre sa croissance.

De plus le CO₂ issue de la décarboxylation de l'urée à un rôle stimulateur vis-à-vis des *Lactobacillus* (**Lemounier et al, 1998**) (Figure 3)

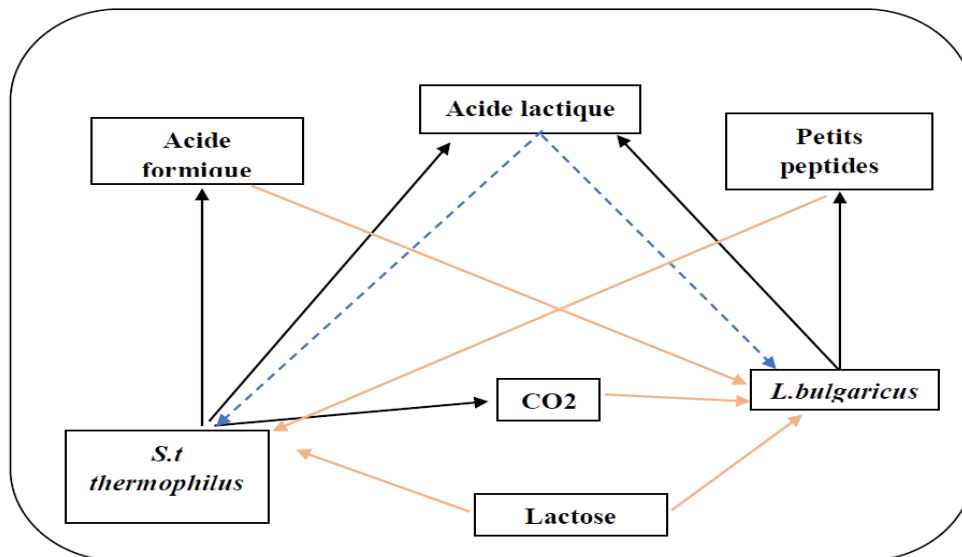


Figure 03. Interaction de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* en culture mixte dans le lait (Mahaut et al, 2000)

Tableau 1. Principaux caractères de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* (Corvi, 1997).

<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
-Croissance optimale (37-42°C). -Ne se développe pas au-dessus de 20°C. -Se développe encore à 50°C. -Supporte un chauffage de 30a 65°C. -Homofermentaire, produit très peu des composés contribuant à l'arôme du yaourt (diacetyl, acétones, acétaldéhyde). -Production de l'acide lactique L(+) jusqu'à une concentration de 0.7-0.8%. -Supporte un milieu acide pH (4-4.5).	-Croissance optimale (42-47). -Limites de développement (15-52°C). -Homofermentaire, mais produit un peu d'acétaldéhyde responsable de l'arôme du yaourt. -Production d'acide lactique D(-) jusqu'à une concentration de 17%. -Développe une activité protéolytique moyenne et une faible activité lypolytique. -Supporte sans difficulté un milieu acide pH (4-4.5).

5.6. La sélection des bactéries lactiques du yaourt

Les bactéries et les ferments lactiques sont utilisés sous forme concentrée – congelée ou lyophilisé pour fabriquer des produits laitiers par ensemencement direct. Ces techniques permettent de simplifier, standardiser et sécuriser les procédés de fabrication.

La sélection des souches de bactéries lactiques utilisées en industrie se fait selon des critères distincts. Ainsi, différents aspects du métabolisme de *S. thermophilus* ont été étudiés : la vitesse d'acidification, la production de lactate, la production d'arômes et la texture du produit fermenté. L'ensemble de ces études a permis une meilleure connaissance de la physiologie de *S. thermophilus* in vitro qui pourrait être exploitée en vue d'une amélioration de la qualité organoleptique des différents produits laitiers (**Lemounier et al, 1998**).

La fabrication de ces deux types de yaourts peut être réalisée soit à partir de lait entier, soit à partir de lait partiellement ou totalement écrémé (3.5% ; 1.0% ; 0.0% de Mg) (**Belkadi et Belmaaziz, 2015**).

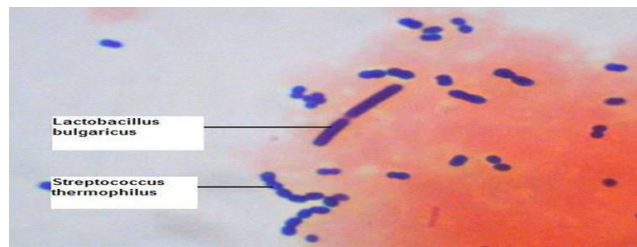


Figure 04. Les bactéries lactiques du yaourt. (Vue microscopique). (**Benoit, 2004**)

6. Fabrication de yaourt

6-1- Préparation de lait

Cette étape est facultative. On peut ajouter 2 à 3% de poudre de lait (20 à 30g par litre de lait) pour accroître la consistance et obtenir des yaourts bien fermes. Plus on ajoute de poudre de lait, plus le yaourt devient ferme. On choisira de la poudre de lait écrémé, moins chère et tout aussi efficace que la poudre de lait entier. On veillera à conserver la poudre de lait dans un endroit frais, sec et protégé (**Christine, 2010**).

6-2- Pasteurisation La température de pasteurisation en cuve avec agitateur varie entre 90°C à 95°C pendant quelques secondes. Plus le lait est « sale », plus la température et le temps de pasteurisation seront importants (**Patrick et al, 2010**).

6-3- Refroidissement

Après chauffage, le lait est refroidi à 45°C cette température est maintenue lors de la fermentation (Mechtoun, 2014).

6-4- Ensemencement

C'est l'inoculation dans le lait des deux germes spécifiques du yaourt, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* à des rapports 2/1 pour le yaourt nature et jusqu'à 10/1 pour les yaourts fruités (Luquet, 1990). La quantité de culture ajoutée au lait peut être influencée par l'activité des germes, le temps et la température d'incubation (Corvi, 1997). Ainsi, pour les températures d'incubation de (40 à 50°C), le taux d'ensemencement se situe entre 1 et 3% (Luquet, 1990). En outre, la répartition des germes doit être bonne et régulière dans le lait et l'activité du levain doit atteindre en fin d'incubation 85 à 90°D (Guyot, 1992).

6-5- Conditionnement

Le conditionnement des yaourts s'effectue dans deux types d'emballages, en verre ou en plastique. Ainsi, afin que l'opération suivante d'étuvage puisse démarrer dans les meilleures conditions, il est nécessaire de maintenir la température du lait en pots à 45°C (Luquet, 1990).

6-6- Incubation (fermentation)

Durant cette étape on assiste au développement de l'acidité du yaourt. Celle-ci est sous la dépendance de la température et la durée de fermentation des germes ensemencés. Ainsi, il est préférable d'appliquer une température proche de celle optimale de développement de

Streptococcus thermophilus soit (42 à 45°C), plutôt que celle proche de l'optimum du *Lactobacillus bulgaricus* (47 à 50°C). En générale les Streptocoques assurent le départ de la fermentation lactique. Cette température voisine de (42 à 45°C), est considérée comme étant la température symbiotique optimum entre les *Streptocoques thermophilus* et *Lactobacilles bulgaricus* (Luquet, 1990).

6-7- Arrêt de fermentation

Il est nécessaire des produits fines bloquer l'acidification des yaourts par l'application d'un refroidissement rapide à la température de 4 à 5°C ; ce qui inhibe l'activité des bactéries lactiques (Keddar et Koubich 2009).

6-8 Conservation

Le yaourt doit être conservé au réfrigérateur. Sa consommation doit intervenir avant la date de péremption figurant sur l'emballage (24 jours après la fabrication). Lorsqu'un récipient est ouvert, il convient de consommer son contenu rapidement pour éviter l'installation des moisissures (**Dupin et al 1992**).

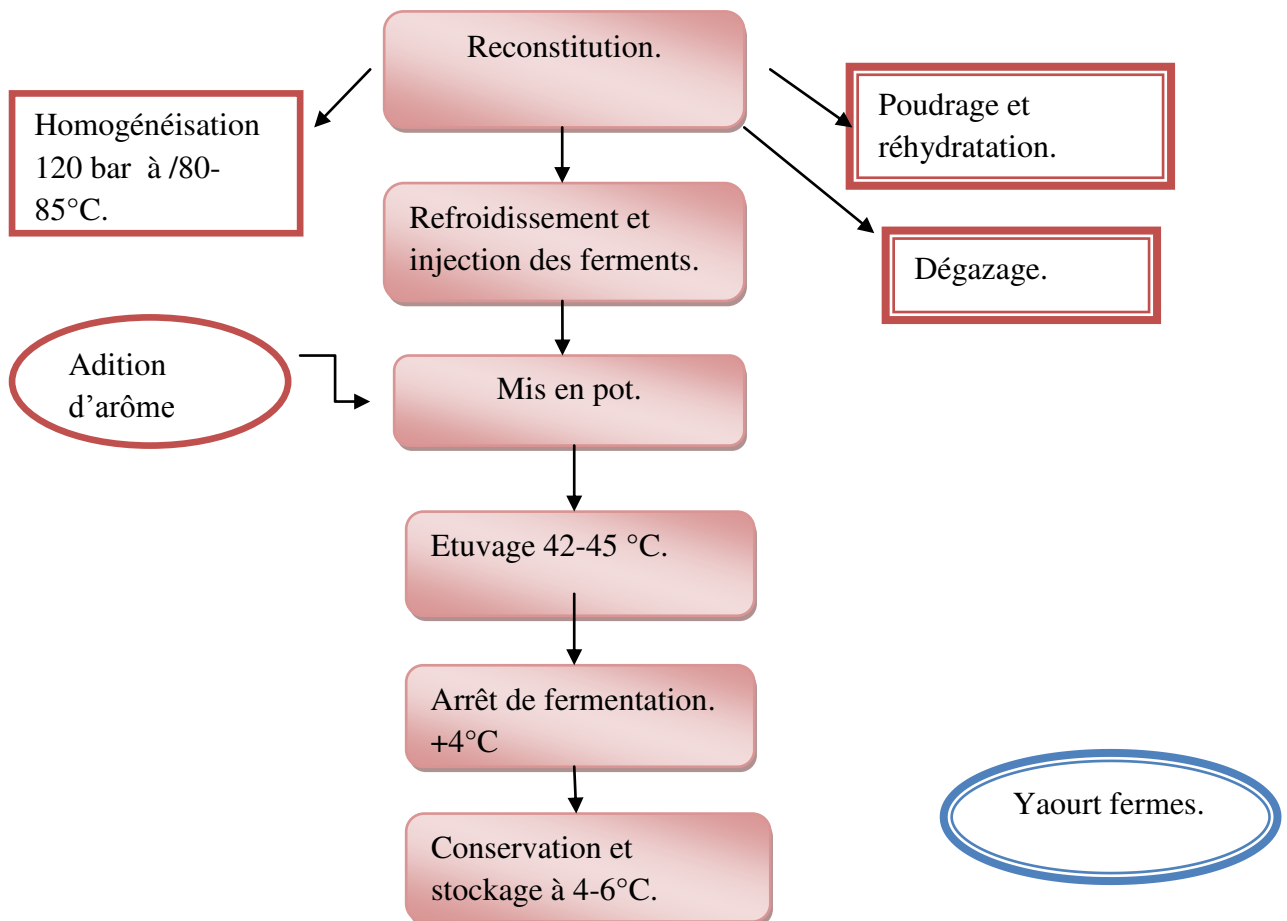


Figure 05. Diagramme de fabrication des yaourts (**Tamine, 2005**).

7. Qualité du yaourt

7.1. Aspects physico-chimique

Le yaourt doit répondre aux caractéristiques suivantes :

- Couleur franche et uniforme ;
- Goût franc et parfum caractéristique ;

-Texture homogène (pour le yaourt brasse) et ferme (pour le yaourt étuvé) (**Paci Kora, 2004**).

7.2. Aspects hygiéniques

Selon la norme nationale de **1998, N°35** parue au journal officiel, les yaourts ne doivent contenir aucun germe pathogène (Tableau02).

Le traitement thermique appliqué sur le lait avant fabrication du yaourt est suffisant pour détruire les micro-organismes non sporulés pathogènes ou non. Leur présence dans le yaourt ne peut être que de manière accidentelle. Le pH acide du yaourt le rend hostile aux germes pathogènes, comme pour la plupart des autres germes indésirables.

Les levures et les moisissures peuvent néanmoins se développer dans le yaourt. Ces dernières proviennent principalement de l'air ambiant dont la contamination se situe au stade du conditionnement (**Larpent et Bourgeois, 1989**).

Tableau 02. Normes microbiologiques pour le yaourt (**Lompo et al, 2006**).

Germes	Normes (UFC/g)
Bactéries lactiques	$<10^8$
Coliformes totaux	<10
Coliformes thermo tolérants	<1
E.coli	<1

7.3. Défauts et altérations du produit

Comme l'élaboration du yaourt fait intervenir plusieurs étapes clés ou la fermentation et la formation du gel doivent être minutieusement dirigées et surveillées, il est fréquent que des altérations de goût, d'apparence et de texture apparaissent et dont certaines sont préjudiciable à la qualité finale du produit (**Luquet, 1985**).

7.4. Comportement rhéologique

La transformation du lait en yaourt s'accompagne aussi d'un changement des propriétés rhéologique en passant d'un liquide à un gel à destruction non réversible. Les additifs et les étapes du procédé de fabrication jouent également un rôle sur ce comportement (**Paci Kora, 2004**).

8. Apports nutritionnels du yaourt

Les valeurs nutritionnelles du lait sont tout à fait transposables au yaourt. En effet, le yaourt concentre les qualités nutritionnelles du lait auxquelles s'ajoutent les propriétés apportées par les ferments lactiques. Plusieurs facteurs interviennent dans la composition finale du yaourt :

- Les souches utilisées pour la fermentation du lait ;
- La nature du lait utilisé (entier, demi écrémé ou écrémé) ;
- Les procédés de fabrication (température, durée de fermentation...) (**Dieng, 2001**).

Grace à sa haute teneur en eau de plus de 80%, le yaourt est un aliment hydratant. Il contient du lactose qui est la source de carbone majoritaire. Pendant la fermentation, ce disaccharide est hydrolysé en glucose et galactose (**Hutkins et al, 1975**).

C'est aussi une source des protéines avec 5g des protéines par pot ; valeur supérieure à la teneur en protéine du lait, suite à l'ajout de poudre de lait écrémé lors de fabrication du yaourt. Ainsi les caséines et les protéines du lactosérum présentent une source riche en acides aminés, car les protéines du yaourt sont plus digestibles que celle du lait suite à leur hydrolyse par les bactéries lactiques (**Shahani et Chandan, 1979**).

8.1. Apport modéré en énergie

La teneur en matière grasse du yaourt dépend de la nature de lait utilisé. Le yaourt est le produit laitier qui contient le moins de matière grasse en comparaison avec d'autres produits comme les fromages.

9.2. Apport en minéraux et vitamines

Le yaourt est particulièrement riche en minéraux et oligo-éléments. Un pot de yaourt couvre 13% des besoins journaliers en phosphore et 16% des besoins de calcium d'un adulte. Lors de la fermentation du yaourt, l'acide lactique produit permet la solubilisation du calcium.

Le yaourt est aussi une source des vitamines. Ces vitamines sont hydrosolubles et ne sont donc pas stockées dans l'organisme (à l'exception de la vitamine B12). De ce fait leurs apports doivent être assurés quotidiennement par notre alimentation. Ces vitamines sont impliquées dans des nombreuses fonctions : construction (croissance, développement

squelette...), fonctionnement et entretien de divers tissus et systèmes (transformation et utilisation des macronutriments, coagulation du sang...) (**Shahani et Chandan, 1979**).

8. 3. Contaminations du yaourt

Le traitement thermique du lait avant fabrication étant suffisant pour détruire les microorganismes non sporulés pathogènes ou non ; la présence de ces germes dans le yaourt ne peut être qu'accidentelle. Mais, il est à noter qu'un yaourt à un pH inférieure ou égale à 4,0 (donc contenant environ 1% de l'acide lactique) est un milieu hostile pour les bactéries pathogènes, comme la plupart des autres bactéries indésirables.

En ce qu'il concerne les microorganismes non pathogènes, levures et les moisissures, ils sont capables de se développer dans le yaourt. De nombreuses moisissures ne sont pas gênées par l'acidité et disposent, avec le saccharose et lactose résiduels, d'une source abondante d'énergie. Ces moisissures peuvent former une couche de mycélium à la surface du yaourt quand l'emballage reste immobile pendant un certain temps ; alors que les levures peuvent se développer à la surface ou dans la masse.

Le traitement thermique du lait, relativement important et suffisant pour détruire les levures et les moisissures. Les préparations des fruits ajoutées après acidification, ont pendant longtemps été des sources importantes des moisissures, mais elles sont traitées thermiques avant leur utilisation.

La prévention de ces contaminations se situe principalement au stade de conditionnement. Toute une gamme des machines de conditionnement a été développée, offrant différents niveaux de protection vis-à-vis de l'air ambiant, allant de conditionnement propre qui limite les mouvements de l'air autour de produit, au conditionnement aseptique qui isole entièrement la zone de conditionnement, préalablement rendue stérile. Des solutions intermédiaires, baptisées conditionnement « ultra-propre », consistent à isoler la zone de conditionnement sans imposer sa stérilisation préalable. Le fabricant de yaourt a donc la possibilité d'ajuster au mieux le coût du conditionnement en fonction des risques potentiels de retour de ses produits, consécutifs à des contaminations (**Bourgeois et Larpent, 1989**).

Tableau 03.Représente les problèmes de fabrication du yaourt.

Nature	Origine possible
Amertume	-Trop long conservation. -Contamination par des microorganismes indésirables. -Trop des ferments.
Goût plat, absence d'arôme	-Mauvaise activité des ferments, incubation trop courte ou a trop basse température. -Taux de matière sèche très faible.
Manque d'acidité	-Manque d'activité des ferments
Trop d'acidité	-Taux d'ensemencement du streptocoque fort. -Incubation trop long ou a température très élevé. -Refroidissement trop long. -Conservation à haute température, rupture de la chaine du froid.

Chapitre II :
Généralités sur le
Rosmarinus officinalis

1. Généralités

Les plantes aromatiques et les plantes médicinales constituent une richesse naturelle très importante dont la valorisation demande une parfaite connaissance des propriétés à mettre en valeur. Les propriétés des plantes dépendent de la présence des agents bioactifs variés et appartenant à différentes classes chimiques (**Mailhebiau, 1994**). Parmi ces plantes on a :

Rosmarinus officinalis, très utilisé depuis plusieurs siècles, a suscité la curiosité de nombreux chimistes. Ainsi, nous en connaissons actuellement assez précisément la composition chimique.

2. Historique

Le romarin, chargé de symbole chez les Anciens qui en faisait des couronnes, a servi à l'élaboration d'un remède longtemps réputé, « l'Eau de la reine de Hongrie » qui en fait est un alcoolat : à l'aide de ce remède, la souveraine, âgée de 72 ans, guérit des rhumatismes et de la podagr (**Botineau, 2010**). Les médecins arabes utilisaient beaucoup le romarin et ce sont eux qui réussirent les premiers à en extraire l'huile essentielle (**Fuinel, 2003**).

3. Définition

Le romarin *Rosmarinus officinalis* est une plante médicinale originaire du bassin méditerranéen qui pousse à l'état sauvage. Le romarin aime les terrains calcaires et s'accommode très bien à des contrées arides et rocailleuses. On le reconnaît aisément, toute l'année. Ce sont les feuilles, les sommités fleuries, qu'on aura pris le soin de sécher, qui souvent utilisées en phytothérapie. Le romarin, comme toutes les plantes aromatiques et médicinales, contient des composés chimiques ayant des propriétés antibactériennes a fait l'objet de récentes recherches dans les domaines pharmaceutique et agroalimentaire Il possède des propriétés anti-inflammatoires et antispasmodiques (**Boullard, 2010**).



Figure 06 : Photo de *Rosmarinus officinalis* (Wikipédia, 2018).

4. Appellations régionales en Algérie : En plus souvent

- ❖ Région de l'Est : Eklil
- ❖ Région de l'Ouest : Helhal
- ❖ Région du Centre : Yazir (Lucienne, 2007).

5. Description botanique

Le Romarin, plante commune à l'état sauvage, est l'une des plantes les plus populaires en Algérie, puisqu'on la trouve dans tous les jardins et les parcs en bordure odorante (Zerman, 2010). Le romarin est un arbrisseau de la famille des labiées (Zeghad, 2009). de 50 cm à 1 mètre et plus, toujours vert, très aromatique, très rameux, très feuillé (Makhlofi, 2014). Les feuilles sont coriaces, persistantes, linéaires, entières, enroulées sur les bords, vertes et ponctuées dessus, blanches tomenteuses à la face inférieure (Rameau et Durné2008). Son écorce s'écaille sur les branches les plus âgées et son odeur est extrêmement odorante (Makhlofi ,2014).La floraison commence dès les mois de janvier/ février et se poursuit jusqu'en avril – mai (Zeghad, 2009). Les fleurs sont réunies au sommet des rameaux, bleues pâles à blanchâtre, pratiquement sessiles, disposées en petites grappes axillaires et terminales, bractées tomenteuses lancéolées (Rameau,et Durné,2008). Le calice velu à dents bordées de blanc, elles portent deux étamines ayant une petite dent vers leur base comme pour la plupart des Lamiacées (Zeghad, 2009). Le fruit, ovoïde, est entouré par un calice persistant, sec est constitué de quatre akènes (tétrakène). Il attire les insectes (entomophiles) pour assurer la pollinisation (entomogame) (Eloutasi, 2004).

6. position systématique de l'espèce *Rosmarinus officinalis*

Règne	<i>Plantes</i>
Embranchement	<i>Spermaphytes</i>
Sous- embranchement	<i>Angiospermes</i>
Classe	<i>dicotylédones</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Genre	<i>Rosmarinu</i>
Espèce	<i>Rosmarinus officinalis</i>

(Quezel et Santa, 1963)



Figure 07 : photo représente les parties de la plante du *Rosmarinus officinalis*

7. Caractéristiques de la famille des Lamiacées

La famille des lamiacées est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antimicrobien, antifongique, anti-inflammatoire et antioxydant (**Gherman et al 2000, Hilan et al., 2006**). Les huiles essentielles caractérisent cette famille.

Cette famille comprend près de 6700 espèces regroupées dans environ 250 genres. (**Miller et al, 2006**). Les labiées sont des arbustes, sous arbrisseaux, ou plantes herbacées en générale odorantes, à tige quadrangulaires, feuilles en général opposées sans stipules. Fleurs pentamères en générale hermaphrodites. Calice à cinq divisions. Corolle en générale bilabée longuement tubuleuse parfois à 4-5 lobes subégaux ou à une seule lèvre, lèvre inférieure trilobée, la supérieure bilobée. Étamines 4, la cinquième nulle ou très réduite, parfois deux étamines et deux staminodes. Ovaire super à carpelles originellement bi-ovulés, ensuite uniovulés par la constitution d'une fausse cloison. (**Quezel et santa 1963**).

Les lamiacées sont très nombreuses les espèces les plus cités dans la littérature sont : *Salvia ,officinalis* (**Fellah et al, 2006**), *Mentha spicata* (**Choudhury et al., 2006**),*Origanum vulgare*

8. Répartition géographique

Le romarin spontané qui pousse sur les côtes méditerranéennes, et le sud-ouest de l'Asie, est souvent cultivé dans les jardins comme clôture. On le trouve essentiellement dans les garrigues maquis non loin de la mer (**Zoubiedi, 2004**) .En Algérie, le romarin est l'une des

sept espèces végétales excédant 50.000 hectares sur le territoire national (**Zoubiedi, 2004**) . C'est une plante pérenne de type arbrisseau qui peut vivre plus de 20 ans (**Mathonnet, 2012**), mais en culture, il faut compter une douzaine d'années de vie (**Zoubiedi, 2004**). L'aire géographique du romarin est spécifiquement méditerranéenne, il est répandu dans les pays européens, en France, en Espagne, au Portugal. De l'autre côté de Gibraltar on le retrouve au Maroc, en Tunisie et en Libye; mais qu'il est abondant, il devient rare et ne se manifeste que dans quelques stations isolées en Egypte, en Palestine, il réapparaît en Turquie, en Grèce et en Italie (**Helal, 2010**).

9. Récolte du Romarin

De manière générale, la récolte d'une plante est réalisée quand les principes actifs sont à leur maximum, afin de pouvoir compter sur des effets utiles et constants. Les feuilles et tiges herbacées sont récoltées lorsque la fleur commence à se développer, 12 à 18 mois après plantation (**Reclu, 2004**). Les feuilles se récoltent toute l'année mais sont plus parfumées au printemps. Il faut donc les cueillir à cette période. La récolte se fait par temps chaud et sec soit deux ou trois heures après le lever du soleil quand la rosée s'est dissipée (**Reclu, 2004 ; Gilly, 2005 ; Harding, 2011**).

Quant aux fleurs et sommités fleuries (partie supérieure du végétal), elles sont récoltées au même moment de la journée que les feuilles quand les fleurs commencent à s'épanouir. L'odeur résidant principalement dans le calice, celui-ci doit être pris délicatement et séché. La récolte des sommités fleuries a lieu au mois de juillet (**Reclu, 2004**). Séchée est passée au crible afin de n'obtenir plus que des feuilles et des fleurs (**Gilly, 2005**).

Afin de ne pas abîmer les plantes sauvages, les récoltes seront modestes (**Scherf, 2012**).

Pour le séchage des feuilles et tiges herbacées : étalées sur des châssis de toile à larges mailles ou sur de la paille bien séchées, et sécher dans une pièce exposée aux rayons du soleil. Il faut les brasser régulièrement afin que l'air pénètre uniformément. A conserver dans une pièce non humide (**Reclu, 2004**). Les feuilles séchées sont ensuite séparées des tiges (**Scherf, 2012**).

Fleurs et sommités fleuries : espacées sur des claies garnies de papier, remuées de temps en temps, dans une pièce ensoleillée ou à l'étuve (**Reclu, 2004**). Une fois sec, conserver le Romarin dans des bocaux ou boîtes garnis de papier et bouchés enveloppés dans du papier et gardées au sec. Conservation : environ un an (**Reclu, 2004**).

10. Saveur, arôme et valeur nutritive

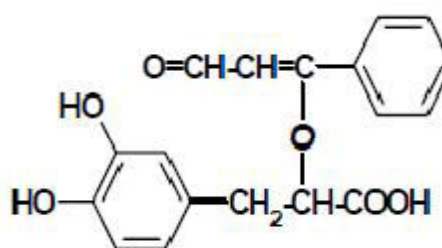
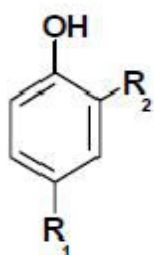
Le romarin possède une odeur légèrement camphrée et une saveur piquante et parfumé assez prononcée (**Mini-encyclopédie des aliments, 2008**), il contient plusieurs éléments nutritifs (Voir tableau 04).

Tableau 04. Composition des éléments nutritifs de romarin séché (**USDA ,2011**).

Nutriments	Unités	Valeur par 100g
Eau	g	9.31
Energie	kcal	331
Protéines	g	4,88
Total des lipides (matières grasses)	g	15 ,22
Glucides par différences	g	64,04
Total des fibres alimentaires	g	42,6
Calcium.Ca	mg	1,280
Totale d'acide ascorbique (Vitamine C)	mg	61,2
Vitamine B-6	mg	1,740
Vitamine B-12	µg	000
Totales des acides gras saturés	g	7,371
Totale des acides gras mono-insaturés	g	3,014

11. Composition phénolique

- **Les acides phénoliques:** les acides phénoliques présents dans le romarin et à des teneurs importantes sont l'acide rosmarinique, l'acide caféique et l'acide vanéllique (**Zoubeydi, 2004**).



- 1) **Acide vanéllique** : R1 (COOH), R2(OCH3)
- 2) **Acide Rosmarinique**
- 3) **Acide caféique** : R1 (CH=CH-COOH), R2(OCH3)

Figure 08: structure des acides phénoliques dans le Romarin (Zoubeidi, 2004).

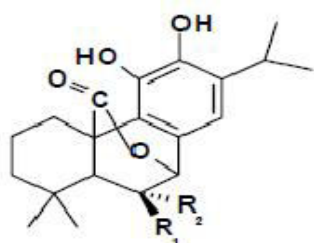
- Flavonoïdes

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange, cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus (flavus=jaune) (Zeghad.N, 2009). Plus de dix flavonoïdes sont isolés et identifiés dans le romarin, la plupart d'entre eux sont des dérivés de flavones dont :

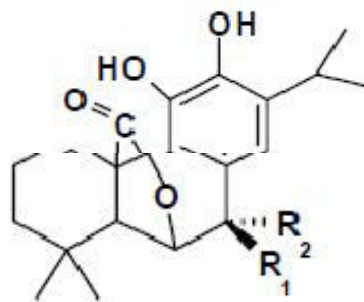
-l'apéginine, le genkwanine, le 6-méthoxygenkwanine, etc... (Zoubeidi, 2004).

-Diterpènes Actuellement, plus de douze diterpènes, sont isolés et identifiés dans le romarin, ils sont responsables à l'activité antioxydante de la plante (Zoubeidi, 2004).

- Anti cardiovasculaire (Formica J.V. et Regelson W. 1995).
- Anticancéreux (Jodoin J., Demeule M., Béliveau R. 2002)
- Antibactérienne (Petit P, Granier T., Langlois d'Estaintot B., Manigand C., Bathany K., Schmitter J.M. Lauvergeat V., Hamdi S., Gallois B. 2007).



Carnosol: R1 (H), R2 (H)



Rosmanol: R1 (H), R2 (OH)

Figure 09: structure de quelques diterpènes phénoliques du romarin (Zoubeidi, 2004).

12. Propriétés du Romarin.

12.1. Activité antibactérienne

Le Romarin a été testé sous différentes formes contre différentes bactéries à Gram positif ou négatif responsables des différents types de pathologies. Nombreuses pompes (multi-drogue), mais cette activité est susceptible d'être liée à l'inhibition de pompe(s) autre que NorA. Depuis que l'imperméabilité de la membrane bactérienne est considérée comme un mécanisme de

résistance, il est clair que compromettre cette barrière par sa perméabilisation serait une approche efficace pour la lutte contre la résistance aux antimicrobiens.

L'activité antimicrobienne et la modification de la résistance des constituants du Romarin ont été démontrées. Bien que l'activité antimicrobienne puisse ne pas être d'une importance clinique, l'action de modification de la résistance est intéressante puisqu'il n'existe pas d'agent modifiant la résistance connu dans l'utilisation clinique actuelle (Oluwatuyi et al, 2004).il ya aussi Les effets des extraits aqueux et méthanoliques du *Romarin*, sur la croissance du *Streptococcus sobrinus* et sur l'activité extracellulaire de l'enzyme glucosyltransferase ont été étudiés par les résultats ont suggéré que les extraits du *Romarin* peuvent empêcher la lésion de la carie en inhibant la croissance du *Streptococcus sobrinus* et peuvent aussi éliminer les plaques dentaires par suppression de l'activité de la glucosyltransférase (TSAI et al, 2007).

Afin de chercher de nouveaux antibiotiques et des agents antimicrobiens,une autre étude a été élaborée par examiner les effets antimicrobiens des extraits des composés isolés de certaines plantes, sur l'ensemble de 29 bactéries et levures avec pertinence dermatologiques.

L'extrait obtenu par le dioxyde de carbone(CO₂) supercritique du Romarin, a présenté un large spectre antimicrobien.la croissance de 28 sur 29 germes a été empêchée par cet extrait d'acide carnosique (Weckesser et al. 2007).

12.2Activité anti-oxydante

L'activité anti-oxydante du Romarin est connue depuis environ 30 années.

En raison de ses propriétés anti-oxydantes, le Romarin est largement accepté en tant qu'épices dont l'activité anti-oxydante la plus élevée (Wang et al, 2008).

Plusieurs auteurs ont étudié l'utilisation des extraits du Romarin comme antioxydant pour conserver les produits à base de viande (Balentine et al, 2006;Fernandez-Lopez et al, 2005;Sebrotyneket al, 2005).

13. Les huiles essentielles

13.1. Définition des huiles essentielles

Plusieurs définitions disponibles d'une huile essentielle convergent sur le fait que les huiles essentielles, sont appelées aussi « essences ». Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes des métabolites secondaires volatiles, isolés des plantes par hydro distillation ou par expression mécanique. (Delarras C. 2007).

13.2. Composition chimique de romarin L'huile essentielle du romarin

(1 à 2% dans la plante) contient : de l' α -pinène (7à80%), de la verbénone (1 à 37%), du camphre (1 à 38%), de l'eucalyptol (1à 35%), dubornéol (4 à19%), del'acétate de bornyle

(jusqu'à 10%) et du camphène. En plus de l'huile essentielle on trouve dans le romarin : 2 à 4% de dérivés triterpéniques tels que : l'acide ursolique, l'acide oléanolique, l'acétate de germanicol ; des lactones diterpéniques : picrosalvine, dérivés de l'acide carnosolique, rosmanol, rosmadial, des acides phénoliques, des acides gras hydroxylés surtout des dérivés de l'acide décanoïque, des acides gras organiques. L'acide citrique, glycolique et glycérique, des stérols, de la choline, du mucilage (Bellakhdar, 1997) et delarésine (Beloued, 1998). Les sommités fleuries renferment une essence aromatique riche en camphre, en cinéole, en alpha-pinène, en bornéol et en camphène. Elle est riche en tanins, en flavonoïdes (apigénine, diosmine), en diterpènes tricycliques, triterpènes et en acides-phénols, dont l'acide rosmarinique et la rosmarinicine. Entre autre, (Gonzalez trujano et ses collaborateurs (2007)). Ont démontré d'après un criblage phytochimique la présence de flavonoïdes, des tanins, des saponines et l'absence des alcaloïdes. Concernant les éléments minéraux, la spectrométrie d'émission atomique a pu identifier 18 éléments: Al : 146.48 mg/kg ; Ca : 7791.80 mg/kg ; Fe : 330.16 mg/kg ; K : 14916.23 mg/kg ; Mg : 1634.55 mg/kg ; Na : 2711.87 mg/kg ; P : 1474.60 mg/kg ; Cr : 97.36 mg/kg ; Sr : 74.65 mg/kg (Arslan et al, 2007).

Tableau 05 : composition de l'huile essentielles de romarin (Zermane ,2010).

Monoterpènes	Acycliques	Myrcène linalol
	Monocycliques	Terpinéol-4α-terpinéol cinéole Limonène
	Aromatique	p-cymène
	Bicycliques	α-pinène camphène verbénone camphre bornéole acétate de bornyle
Sesquiterpènes		Caryophyllène humulène

13.3. Facteurs influençant la composition

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant diverses conditions : l'environnement, le génotype, l'origine géographique, la période de récolte, la

méthode de séchage, le lieu de séchage, la température et la durée de séchage, les parasites, les virus et les mauvaises herbes. C'est ainsi que l'action des huiles est le résultat de l'effet combiné de leurs composés actifs et inactifs, ces composés inactifs pourraient influencer la disponibilité biologique des composés actifs et plusieurs composants actifs pourraient avoir un effet synergique (Svobda et Hampson, 1999 ; Smallfield, 2003).

13.4. Toxicité des huiles essentielles

Certaines substances naturelles peuvent présenter des effets néfastes pour l'homme au même titre que certaines substances de synthèse. Les huiles essentielles contenant surtout des phénols et des aldéhydes peuvent irriter la peau, les yeux et les muqueuses. Les inflammations cutanées siègent de manière privilégiée sur les paupières et les aisselles. De plus, certaines huiles essentielles peuvent provoquer des réactions cutanées allergiques (Miller et al, 2006). La toxicité des huiles essentielles peut aussi provenir des contaminants (si l'huile essentielle est impure) et/ou des produits de dégradation de celles-ci car elles se modifient à l'air, à la chaleur et à la lumière.

14. Chémotypes de romarin

Un chémotype, ou encore race chimique, désigne une entité chimique distincte au sein d'une même espèce. Certaines espèces de plantes, des champignons ou des microorganismes, présentent des variations chimiques de leur métabolite secondaire en fonction des influences de leurs écosystèmes (altitude, humidité, ensoleillement, etc.), (Nait Achour K, 2012) .Le chémotype d'une huile essentielle est une référence précise qui indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif présent dans l'huile essentielle. Cette classification capitale permet de sélectionner les H.E. pour une utilisation plus précise, plus sûre et plus efficace (Bousbia, 2011) .Le chémotype permettent de différencier les propriétés thérapeutiques de plusieurs cultivars ou variétés au nom identique comme dans le cas du romarin et qui se caractérisent par les mêmes formes de feuilles, de tiges, de fleurs, de couleur, et d'odeur (Bousbia, 2011).

a) Le romarin officinal à camphre

Il est présent en Espagne et en Algérie, il est moins fortement antiseptique mais agissant d'avantage sur le système neuromusculaire. Le camphre se trouve relié au bornéol (Zerman A, 2010).

b) Le romarin officinal à cinéole

Il se trouve en Algérie, en Tunisie, au Maroc et en Italie. La biosynthèse dans ce type se dirige essentiellement vers la formation du 1,8- cinéole(Martini ,2011).Son action est prépondérante sur l'axe pulmonaire (Roux.D ,2008) .

c) Le romarin officinal à verbénone

Il est présent en Espagne, au Portugal et dans le sud-ouest ibérique. Il est particulièrement efficace pour les problèmes digestifs, neurotoxiques et abortifs à fortes doses. Le verbénone est relié au α - pinène (Zerman.A, 2010).

15. Utilisations du romarin « *Rosmarinus officinalis* »

Le romarin est à la fois une plante ornementale, aromatique et médicinale. Les feuilles séchées de *Rosmarinus officinalis* sont utilisées en tant que condiment et rentrent dans la composition des thés et infusions. *Rosmarinus officinalis* sous forme des feuilles séchées ou d'huile essentielle, trouve sa principale utilisation pour la fabrication de produits cosmétiques (parfums, savons, crèmes, et autres préparations). *Rosmarinus officinalis* sert aussi pour produire les antioxydants naturels qui ont plusieurs utilisations dans les industries agroalimentaires, cosmétiques et en pharmaceutiques. (Chafai Elalaoui et al, 2014).

15.1. En alimentation

Le romarin est très utilisé en tant que condiment dans le bassin méditerranéen pour aromatiser les viandes (poulet, canard, lapin, porc, veau, agneau), les poissons, les ragouts, les soupes et les légumes (pommes de terre, aubergines,...) (Duke, 1985). Il existe du miel spécialement produit à partir du nectar des fleurs de romarin. Ce miel très parfumé est appelé "Miel de Narbonne" ou miel de romarin (Bonnier, 1934).

Le romarin est utilisé en infusions, sous forme de poudre, extrait sec ou autres préparations galéniques pour usage interne et externe, principalement contre les douleurs d'estomac (Zoubiedi, 2004).

15.2. En Industrie agro-alimentaire

Les extraits végétaux de romarin présentent un pouvoir antioxydant important et peuvent être appliqués à la conservation des aliments et des huiles lipidiques, ces propriétés sont dues aux acides polyphénoliques(rosmarinique, caféique) (Zoubiedi ,2004) .

15.3 Autres utilisation

Le romarin est souvent cultivé pour son huile aromatique. Dans la médecine traditionnelle ses parties aériennes sont utilisées par voie orale pour soulager la colique rénale, les

dysménorrhées et comme antispasmodique Il est considérée utile pour contrôler l'érosion du sol (**Heinrichetal., 2006**). L'huile du romarin a été largement répandue pendant des siècles, comme un des ingrédients en produits de beauté, savons, parfums, désodorisants, aussi bien pour l'assaisonnement et la conservation des produits alimentaires (**Arnoldetal., 1997**). Il est utilisé sous diverses formes :

- **Décoction**: le faire bouillir en même temps avec de l'eau.
- **Infusion** : le mettre dans un liquide initialement bouillant et le laisser refroidir afin qu'il libère tout les éléments actifs.
- **Autres**: sous forme d'huiles essentielles(en distillant les feuilles), gélules ou bains (**ChenetHo, 1995**).

16. Extraction des composées phénoliques

16.1. Extractions par les solvants

La méthode de cette extraction est basée sur le fait que les essences aromatiques sont solubles dans la plupart des solvants organiques. L'extraction se fait dans des extracteurs de construction variée. Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui par la suite, sera éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne un mélange odorant de consistance pâteuse dont l'huile est extraite par l'alcool. L'extraction par les solvants et leur manque de sélectivité peuvent entraîner de ce fait de nombreuses substances lipophiles (huiles fixes, phospholipides, caroténoïdes, cires, coumarines.) dans le mélange pâteux et imposer par conséquent une purification ultérieure (**Shellie et al, 2004**).

Le solvant choisi, en plus d'être autorisé devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène. Sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait (**Wan et al, 1995**).

16.2. Extraction par macération

La macération est un procédé qui consiste à laisser séjourner une plante dans un solvant à froid pour en extraire les composés solubles (arômes, principes actifs). La macération peut se faire dans une solution alcoolique, de l'eau, une saumure, de l'huile... Cette technique préserve les composés chimiques fragiles car elle est pratiquée à froid mais elle n'est pas toujours aussi efficace que les techniques qui utilisent un chauffage (**Roux ,2008**).

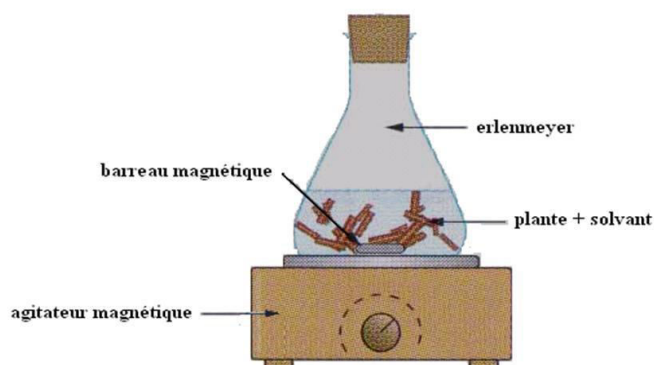
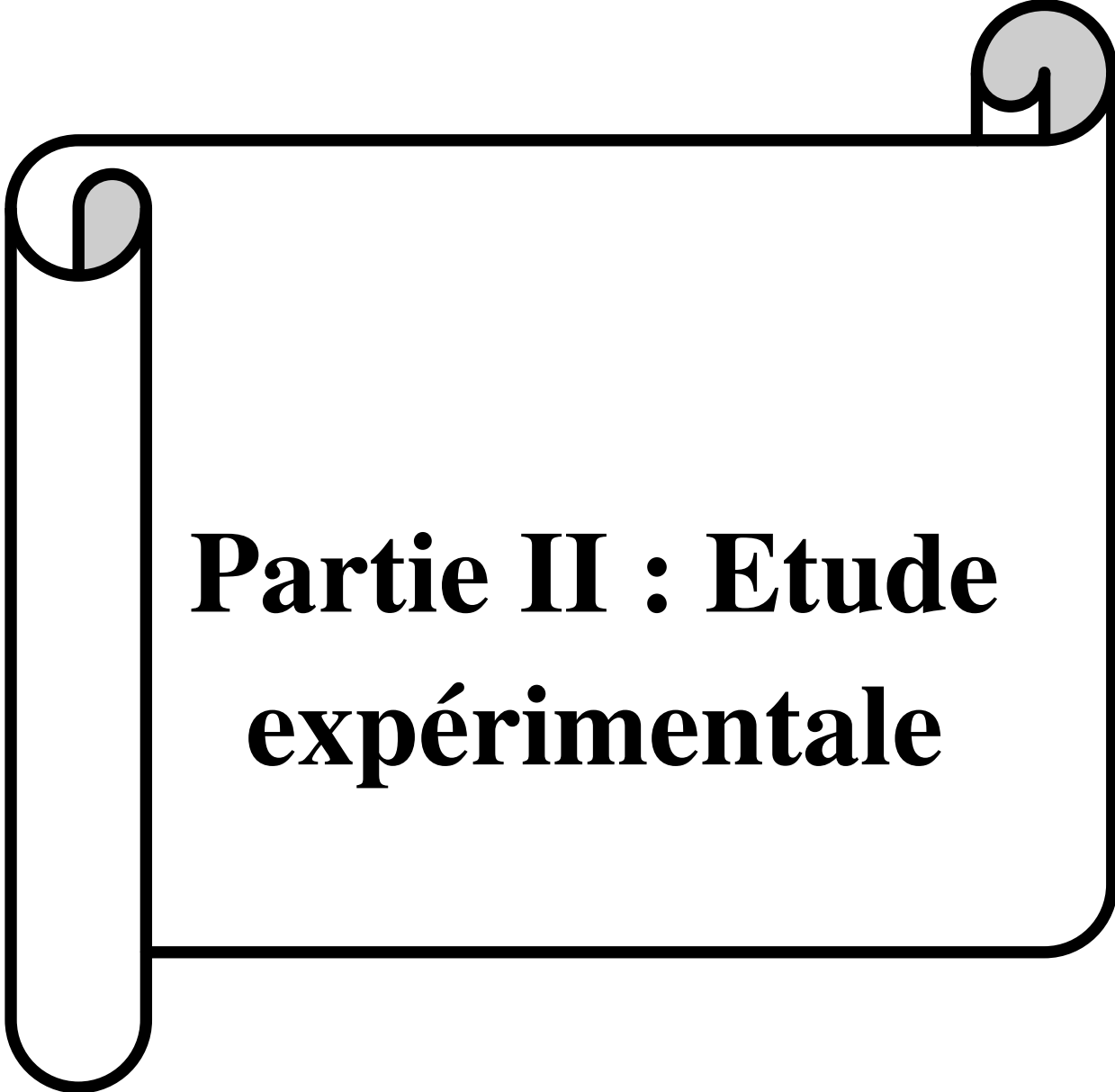


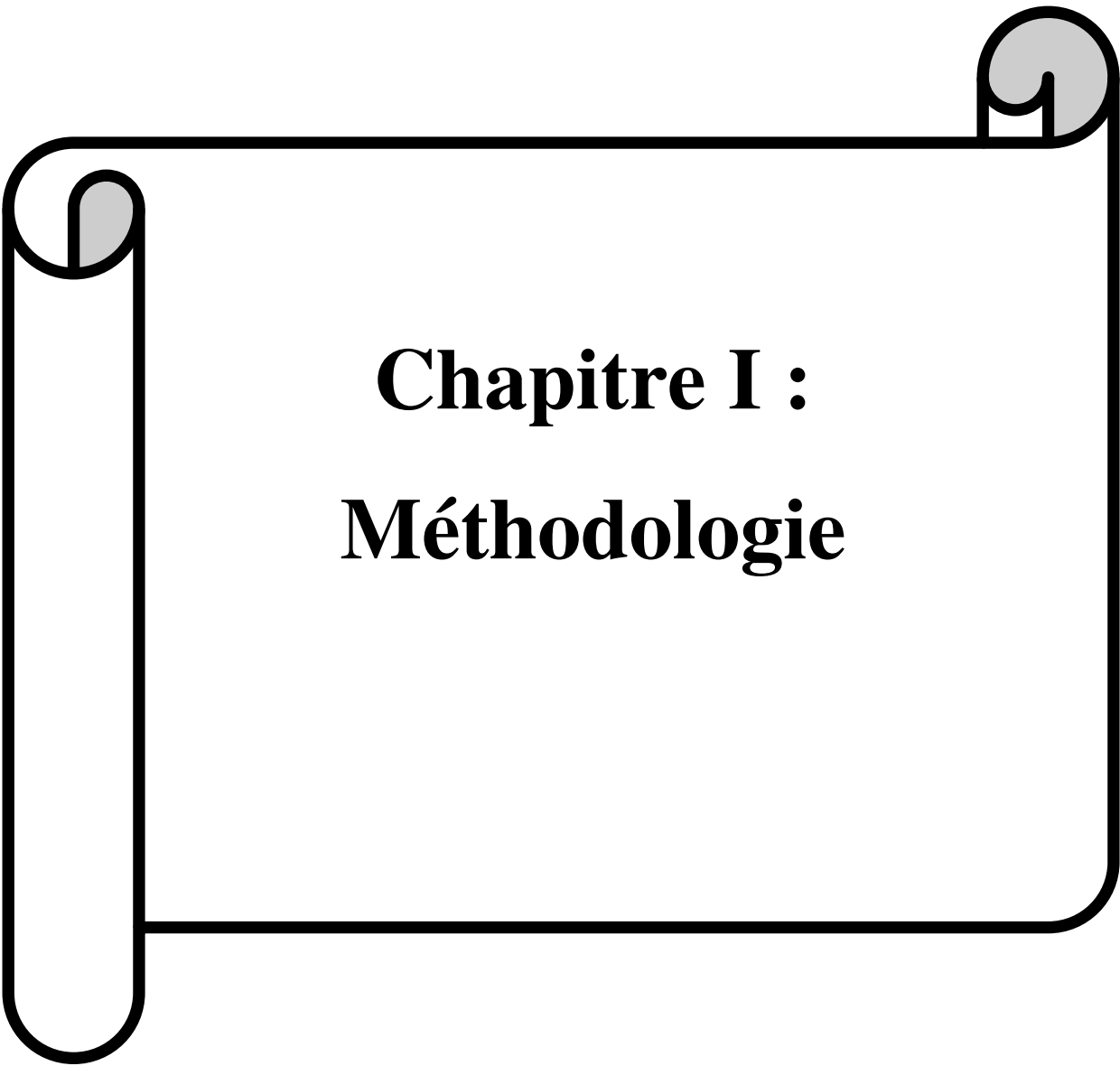
Figure 10 : Schéma représente la macération de la matière végétale (Roux, 2008).

16.3. Extraction méthanolique (EM)

Les extraits du romarin et de l'origan sont obtenus par macération du matériel végétal pulvérisé dans un mélange méthanol/eau (80/ 20). Plusieurs macérations sont nécessaires pour récupérer le maximum des composés naturels. Les différents extraits sont réunis et évaporés à sec à l'aide d'un rotavapor à 40°C.



Partie II : Etude expérimentale



Chapitre I :

Méthodologie

1. Objectif

Les objectifs fixés à travers cette étude expérimentale s'articulent autour de 03 points essentiels :

- 1- Procéder à une extraction des principaux composés bioactifs de la plante par usage d'un solvant polaire à savoir, le méthanol ;
- 2- Suivre les effets antimicrobiens de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* sur les germes spécifiques du yaourt à savoir *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* en vue d'optimiser la manière dont il faut l'incorporer au cours du processus de fabrication d'un lait fermenté type yaourt étuvé ;
- 3- Essayer d'incorporer l'extrait de *Rosmarinus officinalis* à différentes doses dans la fabrication d'un lait fermenté de type yaourt ferme en vue de suivre leurs effets sur la stabilité et la qualité des produits transformés (laits fermentés) durant 21 jours de conservation au froid à 4 °C.

2. Matériel végétal

Le matériel végétal, objet de l'étude, le romarin (*Rosmarinus officinalis*) a été prélevé le mois de janvier 2019, dans la Wilaya de Relizane à l'ouest d'Algérie. Un échantillon de 2kg pris uniquement sur la partie aérienne de l'espèce étudiée a été récolté d'une manière aléatoire dans la région d'Ain Tarik relevant de la Wilaya de l'étude. La matière végétale a été ensuite étalée sur du papier aluminium, puis séchée à l'air ambiant durant 3 semaines, et complétée dans l'étuve pendant 4 jours afin d'éliminer tout l'eau. Les échantillons séchés sont enfin broyés dans un broyeur à lame de cuisine, puis mis dans des bocaux hermétiques et conservés à sec (température ambiante) à l'abri de l'humidité.

3. Extraction des composés bioactifs

Selon Al-Bagieh (1999) et Almas (2001), les extraits à l'eau arrivent à agir en général sur la croissance de certaines bactéries appartenant au genre *Streptococcus* à des taux d'extractions de 5g/100ml de matière végétale de Kikar (*Acacia arabica*) provenant du Pakistan et de l'Arak (*Salvadora persica*) d'Arabie Saoudite.

Pour l'extraction des principaux composés bioactifs tels les poly phénols contenus dans le matériel végétal *Rosmarinus officinalis*, on a opté pour l'utilisation d'une méthode décrite par (Sultana et al, 2009). Cette méthode d'extraction est un procédé d'extraction discontinu solide-liquide par macération et qui consiste à laisser tremper le solide dans un solvant à température ambiante durant quelques temps et à extraire les constituants solubles par évaporation du solvant sous vide.

L'extraction des composés bioactifs de la plante a été réalisée par usage de méthanol comme solvant d'extraction. Elle s'est effectuée sur des prises d'échantillons de 10 g en triples répétitions de matière végétale broyée. Chaque échantillon de broyat de matière végétale est mélangé avec 100 ml de solvant aqueux (80/20, solvant / eau, v / v). L'extraction par macération à froid de chaque mélange est laissée ensuite se poursuivre pendant 6 heures à température ambiante sous agitation. La durée de l'extraction favorisera ainsi la dépolymérisation des principaux composés constitutifs de la plante tels que la lignine ainsi que les substances pectiques et permet une meilleure solubilisation des principaux composés bioactifs.

Les extraits hydro alcooliques obtenus seront filtrés en utilisant un papier filtre Whattman ayant une porosité de 0,2 μ m et débarrassés des solvants par évaporation sous vide à 38 °C l'aide d'un rotavapor.



Figure 11 : Broyage de La plante du romarin

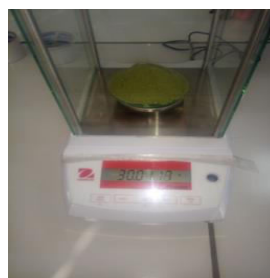
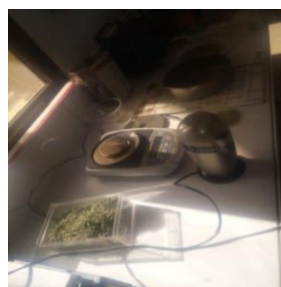


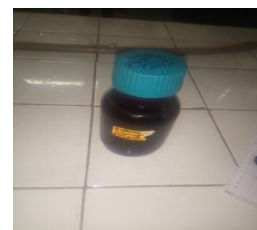
Figure 12 : Extraction par macération



Figure13 : Filtration de l'extrait



Figure 14 : Evaporation par rotavapor



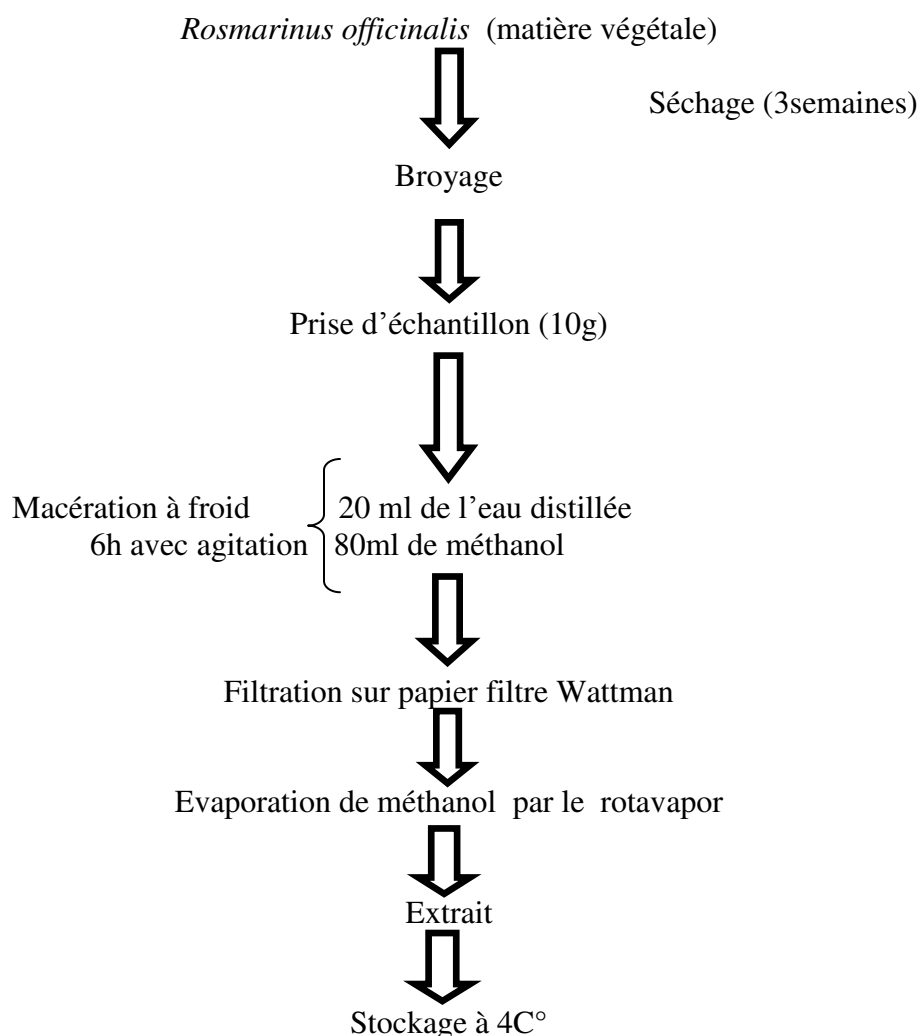


Figure 15. Diagramme d'extraction des composés bioactifs de *Rosmarinus officinalis* (Macheik, 1990).

4. Dosage des poly phénols totaux (Vernerins et Nicholson, 2006).

4.1. Principe

Cette méthode est basée sur l'utilisation de réactif de Folin, ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungestique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PM_{12}O_{40}$), qui sera réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleu de tungstène et de molybdène. La coloration produite dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 760nm, permet de déterminer la quantité des poly phénols présents dans les extraits des végétaux (Boizot et charpentier, 2006).

Une courbe d'étalonnage dressée à partir d'une série de solutions standard d'acide gallique a été réalisée (Ghazy et al, 2005).

4.2. Mode opératoire

0,1ml d'échantillon de l'extrait ou d'acide gallique est mélangé avec 2ml d'une solution de sodium à 2%. Après agitation des tubes et incubation pendant 5minutes, on ajoute 100µl de réactif folin ciocalteu 1N, puis une incubation durant 30minutes à température ambiante.

La lecture est faite à 700nm par spectrophotométrie (Tableau 06).

- Une courbe étalonnage est réalisé en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à différentes concentrations (100, 200, 300, 400,500).

Tableau 06 : Mode opératoire pour le dosage des poly phénols totaux.

Concentration d'acide gallique	100	200	300	400	500	
Acide gallique (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	
Extrait aqueux						0,1
Na ₂ Co ₂ (ml)	2	2	2	2	2	2
Folin ciocalteu	100	100	100	100	100	100
Incubation 30minutes à température ambiante						
La lecture au spectrophotomètre						

La concentration des poly phénols présente dans notre échantillon est calculée selon la formule suivante :

$$[\text{polyphénols}] = a.F/b$$



Figure 16 : Spectrophotomètre série 74

5. Essai de fabrication d'un lait fermenté alicament enrichi d'extraits de romarin

5.1. Protocole expérimental

Le lait cru destiné à la fabrication des laits fermentés expérimentaux est un lait cru pasteurisé fabriqué par l'unité GIPLAIT de Mostaganem.

Les extraits purs méthanoliques de la plante (*Rosmarinus officinalis*) sont incorporés directement dans le lait cru pasteurisé refroidi et maintenu à 45 °C à des taux variables de 0,2,4 et 6% respectivement, pour la confection d'un lait fermenté de type yaourt étuvé.

Les échantillons de lait enrichis d'extraits de romarin sont par la suiteensemencés avec les souches spécifiques du yaourt à un taux de levains de 3% et à un rapport de souches *Streptococcus thermophilus* sur *Lactobacillus bulgaricus* de 2S/L. Aucun additif pouvant masquer les caractéristiques organoleptiques et rhéologiques n'est ajouté aux produits transformés (saccharose, arôme).

Chaque traitement étudié a été représenté par un nombre de répétitions de trois pots d'une capacité de 100ml, soit un nombre total de 09 échantillons expérimentaux.

5.2 Préparation des levains

Un litre de lait servant à la préparation du ferment est préparé à un taux de 130g/l de poudre de lait « écrémé », puis soumis à une pasteurisation thermique durant 2 minutes à 100°C, suivi par un refroidissement à 45°C.

Le lait est ensuite réparti en deux échantillons de 500 et 250 ml. Le premier estensemencé avec 0,5 g d'une prise de la souche lactique lyophilisée pure de *Streptococcus thermophilus*. Le second échantillon avec 0,25 g de la souche pures de *Lactobacillus bulgaricus*. Ces deux échantillons après ensemencement sont mélangés ensemble dans un bécher et étuvés à 45°C pendant 3 heures.

Le levain prés a l'emploi avec un rapport de souches de 2 *Streptococcus thermophilus* pour 1 *Lactobacillus bulgaricus* (2S/1L, v/v) est enfin incorporé dans les laits destinés à la fabrication des laits fermentés alicaments à un taux de 3% (3ml de levain dans 100 ml de lait enrichi ou non d'extrait de romarin et maintenu durant environ 3 heures à 45 °C).

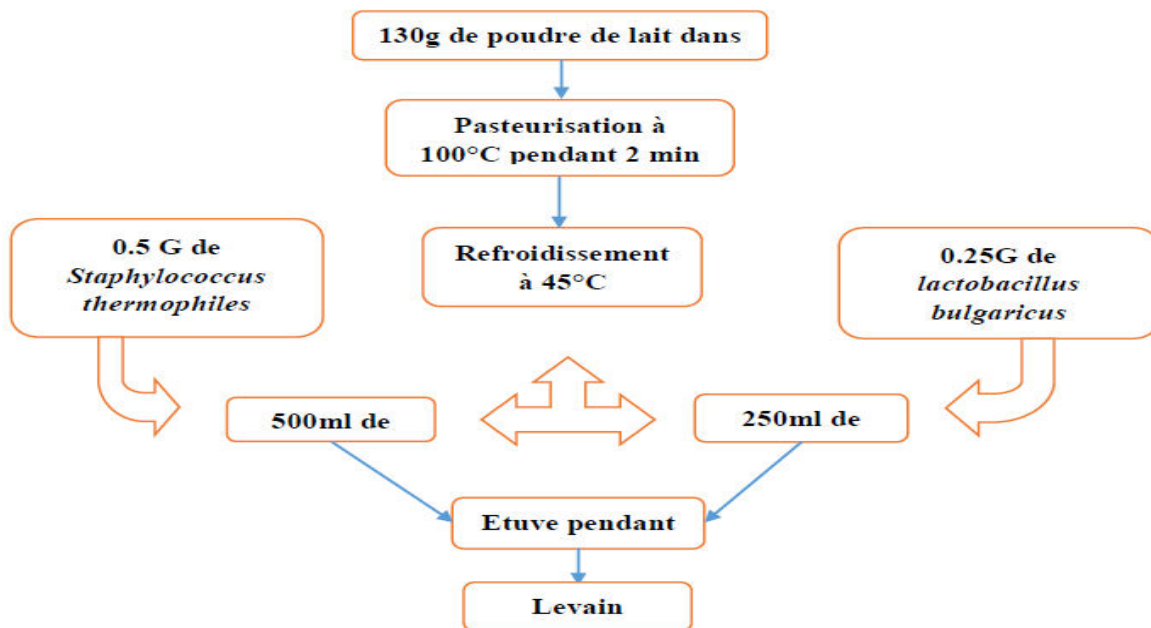


Figure 17 : Diagramme de fabrication de levain lactique.



Figure 17 : Ferments lactiques *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*.



Figure18: Levain lactique réactivé.

5.3 Technologie de fabrication des laits fermentés expérimentaux

Le lait cru (vache) pasteuriser conserver au froid à 4 °C est soumis à un léger chauffage à 45°C. Aux prises d'échantillons (de 03 X 100ml) maintenus à 45°C, sont additionnés les extraits de *Rosmarinus officinalis* à raison de 0, 2, 4 et 6%, respectivement. Les échantillons sont ensuiteensemencés chacun à 3% avec le levain lactique préparé précédemment.

Les pots des différentes préparations sont recouverts par du papier aluminium et laissés fermenter pendant 4 heures dans une étuve réglée à 45°C.

Au terme de la fermentation, les produits expérimentaux une fois caillés ont été conservés au froid positif à 4°C dans un réfrigérateur pendant une période de conservation de 21 jours.

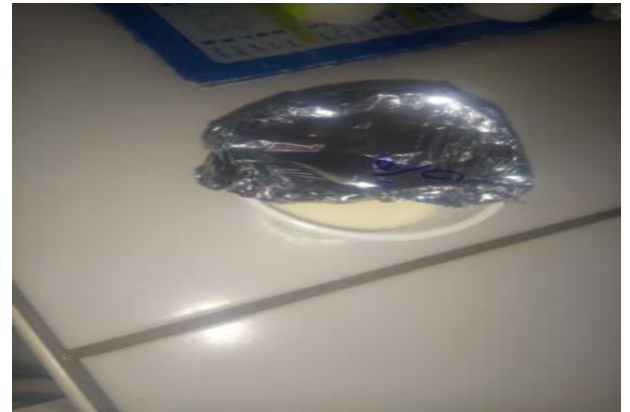


Figure18 : Yaourt étuvé.

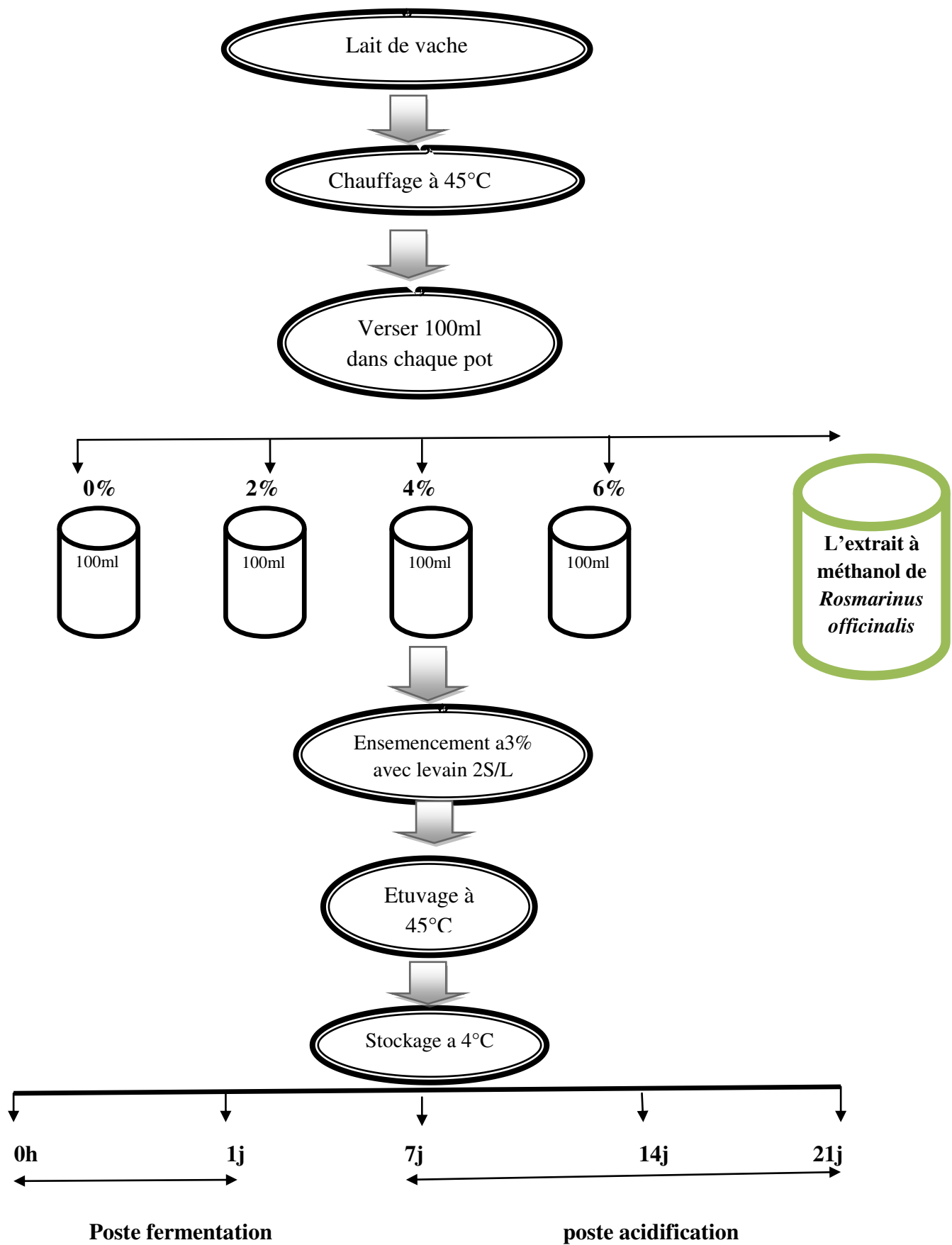


Figure 19: Diagramme de fabrication de yaourt étuvé.

6. Mesures et contrôles

Les différentes mesures et contrôles ont été réalisés en triples essais durant la période de fermentation (0 heure, 2 heures et 3 heures) et la période de post- acidification (1^{er} jour, 7^{ème} jour, 14^{ème} jour et 21^{ème} jour).

6.1 Paramètres physicochimiques

6.1.1 Acidité

L'acidité sera déterminée d'une façon précise par titration de 10ml d'une prise de yaourt à l'aide d'une soude caustique NaOH préparée à 1/9 N en présence de 4 à 5 gouttes de phénophtaléine.



Figure 201 :NaOH +phénophtaléine



Figure 21: Lait fermenté.

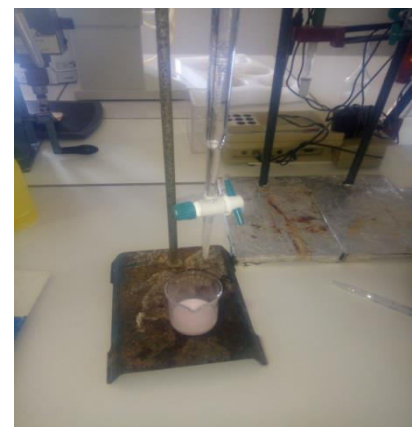


Figure 22: l'appareil utilisé.

6.1.2 pH

Le dosage du pH est réalisé par un pH-mètre étalonné par deux solutions, l'une acide et l'autre basique.



Figure23: pH- mètre

6.1.3 Viscosité dynamique

La viscosité est établie par l'utilisation d'un tube en verre de 2cm de diamètre et de 18cm de longueur équipé d'un chronomètre et d'une bille normalisée.

Le yaourt est un fluide viscoélastique qui possède à la fois les propriétés visqueuses d'un liquide et les propriétés élastiques d'un solide. Le comportement rhéologique du yaourt est de type non newtonien, dans le sens où la viscosité du produit dépend de la vitesse de cisaillement ou de la contrainte exercée. La viscosité est déterminée comme suit :

$$\mu = K \cdot (\xi_{\text{bille}} - \xi_{\text{yaourt}}) \cdot t \quad K = \frac{2 \cdot r^2 \cdot g}{9 \cdot x}$$

$$\text{Donc : } \mu = \left(\frac{2r^2 \cdot g}{9x} \right) \cdot (\xi_{\text{bille}} - \xi_{\text{yaourt}}) \cdot t$$

μ : viscosité dynamique (kg/ms).

K : constante, tel que $K = 74 \cdot 10^{-3} \text{ m}$.

ξ_{bille} : la masse volumique de la bille = 2800 g/m^3 .

ξ_{yaourt} : la masse volumique de yaourt (kg/m^3).

t : temps parcouru pour la bille entre deux points A et B.

r : rayon de la bille tel que. $r = D/2 = 0.6$.

g : la force de pasteur, tel que $g = 9.81 \text{ m/s}^2$.

x : la distance d'écoulement de la bille, $x = 10 \text{ cm}$.



Figure24: Viscosimètre

6.2 Analyses microbiologiques

6.2.1 Méthode d'analyses

On entend par « microorganisme de contamination » tout microorganisme autre que ceux responsables de fermentations spécifique du type du lait fermenté considéré (**JORA n°32 du 23 mai 2004. Arrêt du 27 mars 2004**).

Les dilutions sont toujours effectuées dans des conditions aseptiques. Leur mode de préparation est minutieux. On prépare autant des tubes qu'il y a des dilutions à effectuer en

prenant des tubes stériles contenant 9 ml de l'eau physiologique. Après autoclavage et homogénéisation soigneuse des tubes, on prélève 1 ml de la suspension de départ à l'aide d'une pipette de 1 ml et on le porte dans le premier tube de dilutions (10^{-1}). Il est souvent nécessaire d'aller jusqu'à la dilution 10^{-5} , puis ensemencement des boîtes de pétrie par dilution et par milieu de culture (l'ensemencement en profondeur).

- *Streptococcus thermophilus* : Le dénombrement des germes sera réalisé par culture d'une prise de dilution sur un milieu de culture sélectif « M17 » incubé à 44°C pendant 48h.

- *Lactobacillus bulgaricus* : Le dénombrement des germes sera effectué par culture d'une prise de dilution sur un milieu de culture sélectif « MRS » incubé à 44°C pendant 48h.

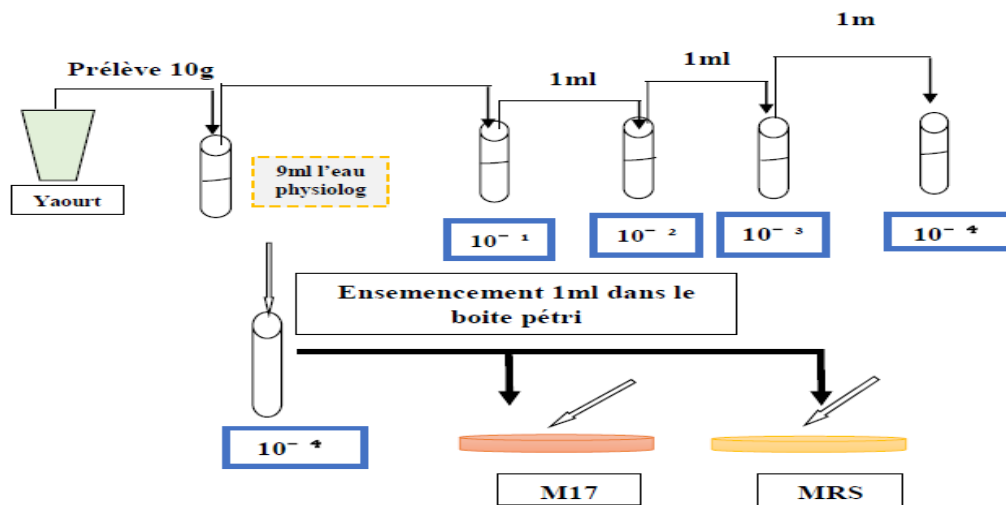


Figure 25 : Diagramme de dilution et ensemencement des boîtes .



Figure26: Ensemencement des boites de pétris

En tenant compte que les boîtes contenant entre 10 et 300 colonies. Le nombre des microorganismes par ml est calculé à l'aide d'un compteur des colonies puis appliquer la formule suivante (**Guiraud, 2003**).

Où :

$$\frac{\sum c}{(n_1 + 0,1n_2) d}$$

Σc : Somme totale des colonies comptées.

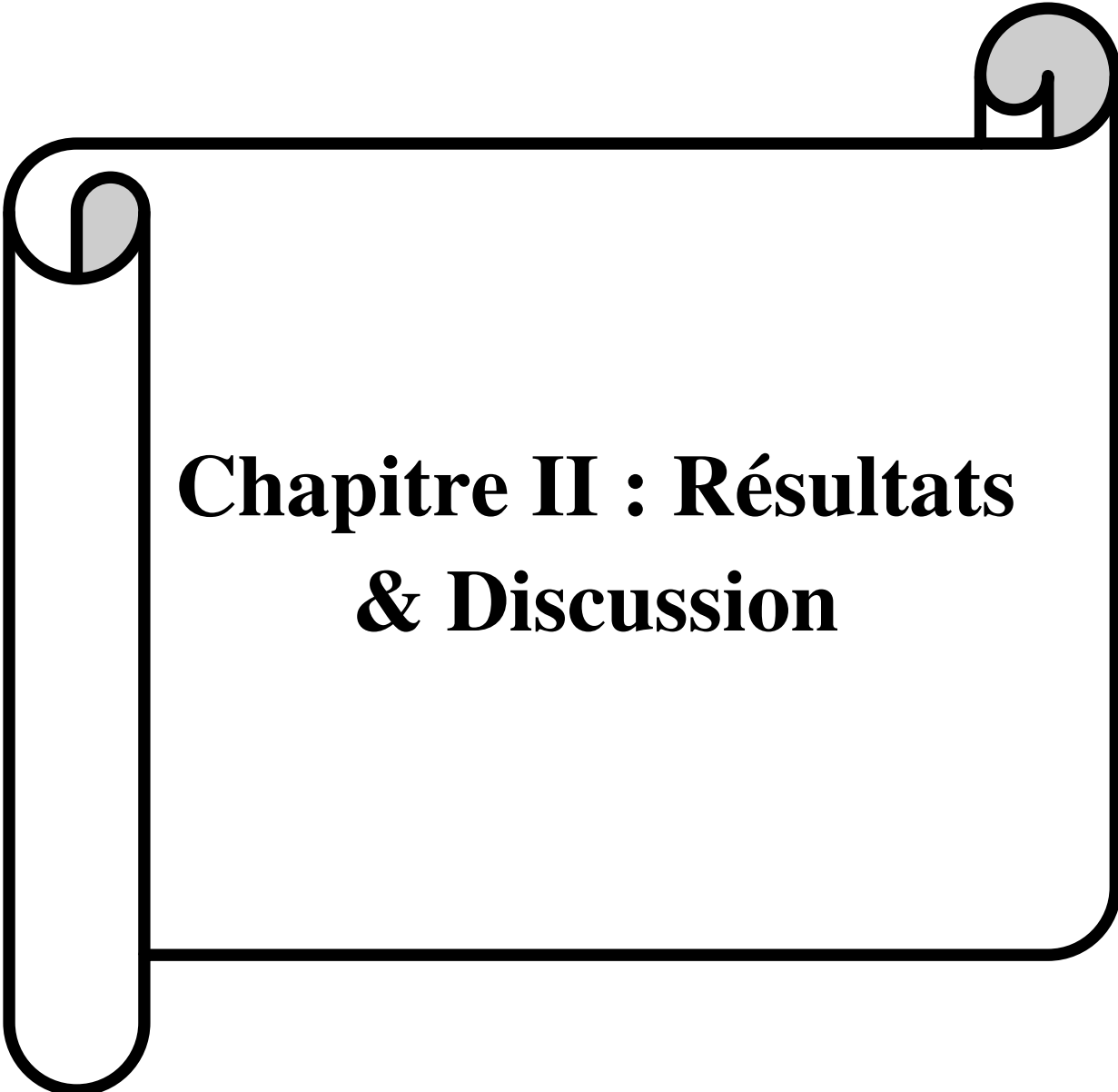
n_1 : Nombre de boîtes comptées dans la première dilution.

n_2 : Nombre de boîtes comptées dans la seconde dilution.

d : Facteur de dilution à partir duquel les premiers comptages ont été obtenus

7. Traitement statistique

Les résultats de différent paramètre sont traités en fonction des moyennes par l'analyse de variance (ANOVA) selon la méthode de Newman et keuls à l'aide d'un logiciel « statbox ».



Chapitre II : Résultats & Discussion

I. Résultats

I.1 analyse biochimique

Les analyses quantitatives des données ont été déterminées à partir de l'équation de la régression linéaire ($y = 0,0043x$) et le coefficient de corrélation ($R^2 = 99\%$) de la courbe d'étalonnage exprimée en mg équivalent l'acide gallique par gramme de matière (mg EAG/g).

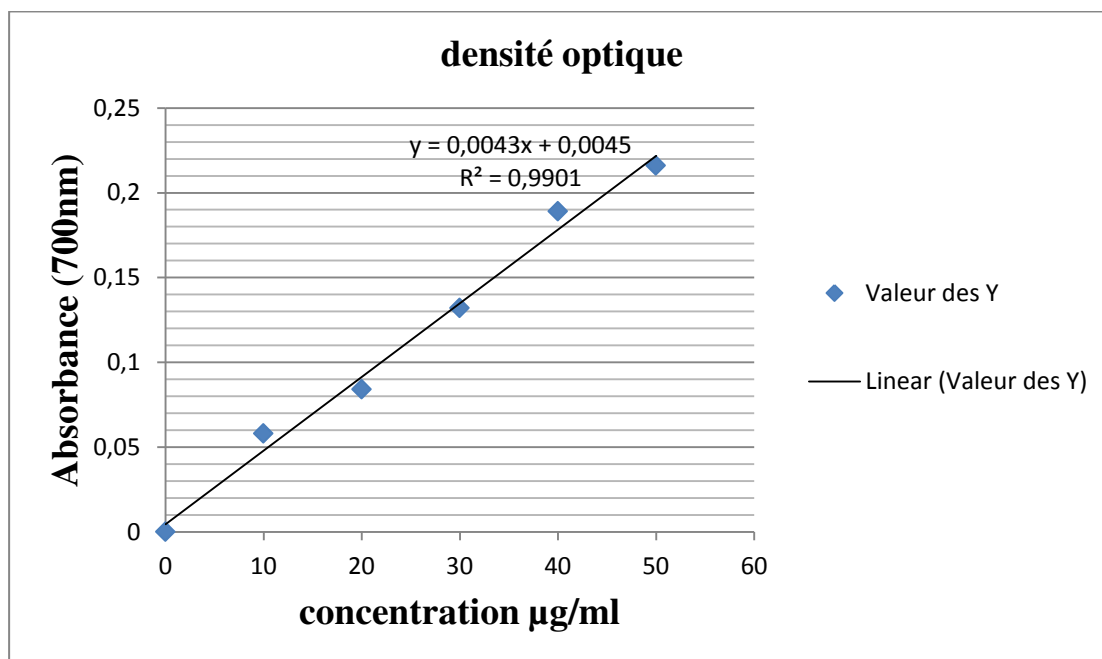


Figure 27 : courbe d'étalonnage d'acide gallique.

Les résultats du dosage révèlent la richesse de l'extrait de Romarin (*Rosmarinus officinalis*) en composés phénolique totaux [379,25mg EAG/g] équivalent a l'acide gallique par gramme de matière végétale sèche. Soit un rapport des teneurs phénoliques totaux est estimé à 75%.

Tableau 07 : Représente le rendement des poly phénols totaux.

Rendement d'extraction	En mg/100g de MS(%)
Les poly phénols totaux	75

- D'après ce résultat biochimique on peut dire que le rendement des poly phénols totaux de la plante du *Rosmarinus officinalis* est très important donc la plante du Romarin est riche en composées bioactives.

I.2 Analyses physico-chimiques

I.2.1. pH

Les résultats d'effets des extraits de romarin sur le pH du lait fermenté au cours de la période de post acidification sont mentionnés dans la **figure 28**.

En général durant toute la période de la fermentation et de post acidification, les valeurs de pH sont marquées par une évolution décroissante de 6,24 à 4,21 en moyenne.

Au cours de cette période les valeurs moyenne de pH varient de (4.75 à 5.45) de (4.5 à 5.25) de (4.29 à 4.52) et de (4.26 à 4.27) durant le 1^{er}, 7^{ème}, 14^{ème} et 21^{ème} jour de stockage des produits, successivement. (**Tableau08**).

L'analyse de variance montre l'effet significatif des doses d'incorporation d'extrait au méthanol de *Rosmarinus officinalis* sur les variations de pH dans les laits fermentés depuis la 2^{ème} heure de fermentation jusqu'au 14^{ème} jour de la période de post acidification.

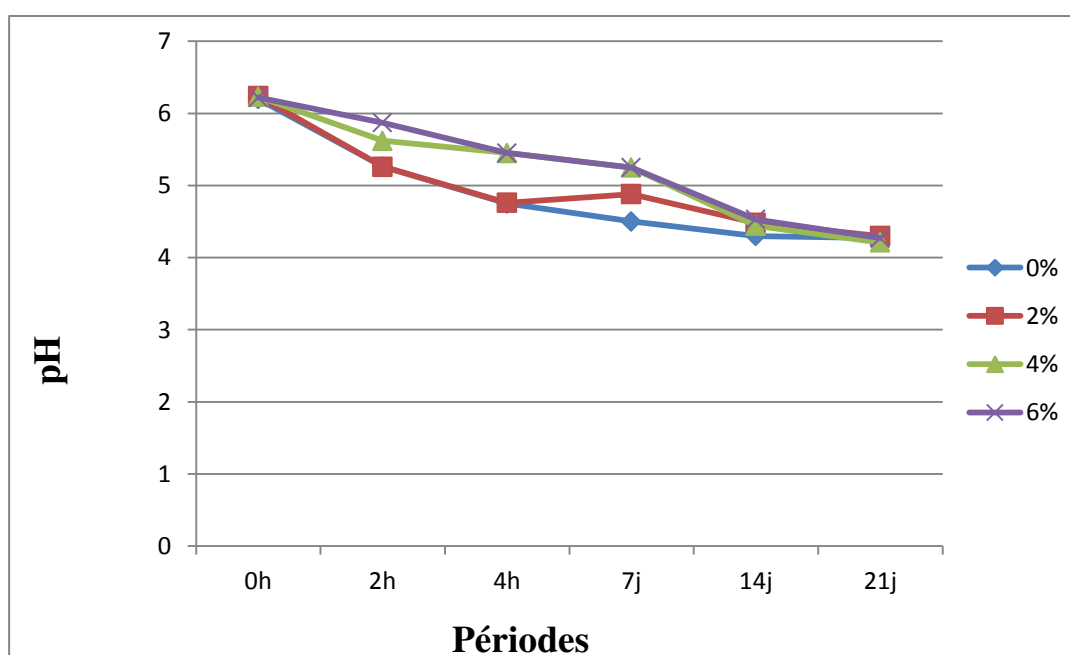


Figure 28. Evolution du pH des laits fermentés additionnés d'extraits de Romarin.

Tableau 08: Evolution du pH des laits fermentés additionnées d'extrait de Romarin.

Facteur étudiés Périodes		Doses d'extrait hydro-méthanolique romarin incorporées				Moyenne	Effet d'extrait hydro- méthanolique du romarin
		0% (témoin)	2%	4%	6%		
Fermentation	0h	6,2 ± 0,1	6,24 ± 0,03	6,237 ± 0,02	6,22 ± 0,11	6,224	NS p>0,05
	2h	5,26 ^c ± 0,04	5,26 ^c ± 0,15	5,61 ^b ± 0,07	5,87 ^a ± 0,06	5,50	HS** p<0,01
	4h	4,75 ^c ± 0,06	4,76 ^c ± 0,15	5,2 ^b ± 0,1	5,45 ^b ± 0,05	5,04	HS** p<0,01
Post-acidification	7j	4,5 ^c ± 0,1	4,88 ^b ± 0,17	5,08 ^a ± 0,05	5,25 ^a ± 0,05	4,92	HS** p<0,01
	14j	4,29 ^b ± 0,04	4,48 ^a ± 0,07	4,44 ^a ± 0,04	4,52 ^a ± 0,03	4,26	HS** p<0,01
	21j	4,26 ± 0,3	4,30 ± 0,09	4,21 ± 0,12	4,27 ± 0,15	4,26	NS p>0,05
Moyenne		4,87	5,04	5,12	5,26		

Les résultats sont exprimé en valeur moyennes plus ou moins écarte type ; facteur étudié doses d'extrait à méthanol de romarin; ** : Effet hautement significatif du facteur étudié doses de l'extrait de romarin incorporés; a, b, c, d : comparaison statistique des moyennes selon le test de Newman et Keuls ; H : heures ; J : jours.

I.2.2 L'acidité Dornic

Au cours de la phase de fermentation, l'évolution de l'acidité des laits fermentés est caractérisée par une augmentation croissante de 19,83 °D en moyenne au 0h à 57,33°D au 1er jr. Au cours de la phase de la post acidification, l'évolution de l'acidité des laits fermentés est caractérisée par une augmentation à 76,08 °D en moyenne au 7^{ème} jour, à 107 °D au 14^{ème} jour, puis à 94,75 °D au 21^{ème} jour de la période de conservation. (**Figure 29**).

Au cours de la phase de post-acidification, l'évolution de l'acidité des laits fermentés est caractérisée par une augmentation remarquable à 76,08°D au 7^{ème} jour, à 107 °D au 14^{ème} jour, puis l'acidité des produits diminue légèrement à 94,75° après 21^{ème} jour de conservation (tableau09). Egalement, ces valeurs s'avèrent augmenter avec les doses d'extrait de Romarin

incorporés lors de la préparation soit des valeurs de l'ordre de 106,67 à 121,67 à 129,33 °D en moyenne pour les doses d'extrait de Romarin variant de 0,2, 4,6%, respectivement dans les laits fermentés.

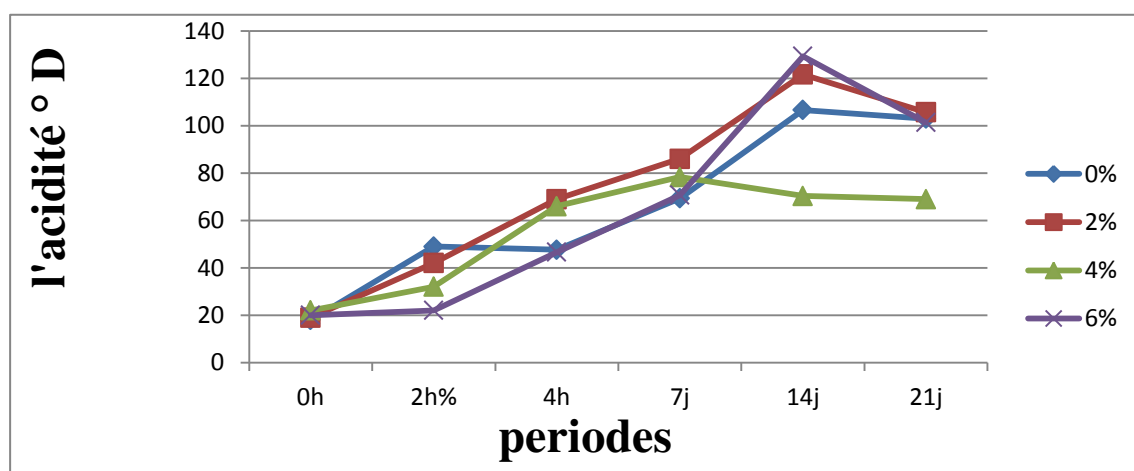


Figure 29 : Evolution de l'acidité des laits fermentés additionnés d'extraits de Romarin.

Tableau 09 : Evolution de l'acidité Dornic des laits fermentés additionnées d'extraits de Romarin.

Facteur étudiés Périodes		Doses d'extrait hydro-méthanolique romarin incorporées				Moyenne	Effet d'extrait hydro- méthanolique du romarin
		0% (témoin)	2%	4%	6%		
Fermentation	0h	18,33 ± 1,52	19 ± 2	20 ± 1	20 ± 1	19,83	NS p>0,05
	2h	49 ^a ± 3,60	42 ^b ± 2	32 ^c ± 2,64	22 ^d ± 2	36,25	HS** p<0,01
	4h	47,66 ^b ± 8,32	69 ^a ± 1	66 ^a ± 6,55	46,67 ^b ± 4,16	57,33	HS** p<0,01
Post- acidification	7j	69,33 ^b ± 5,50	86 ^a ± 2,64	78,33 ^a ± 8,62	70,67 ^b ± 2,51	76,08	S* p<0,05
	14j	106,67 ^b ± 4,04	121,67 ^a ± 7,63	70,33 ^c ± 2,51	129,33 ^a ± 4,04	107	HS** p<0,01
	21j	103 ^a ± 15,716	105,67 ^a ± 5,03	69 ^b ± 5,22	101,33 ^a ± 9,01	94,75	HS** p<0,01
Moyenne		65,65	56,27	55,94	61,67		

Les résultats sont exprimé en valeur moyennes plus ou moins écarte type ; facteur étudié doses d'extrait au méthanol de romarin; **: Effet hautement significatif du facteur étudié doses de l'extrait de romarin incorporés; a, b, c, d : comparaison statistique des moyennes selon le test de Newman et Keuls ; H : heurs ; J : jours.

I.2.3. Viscosité dynamique

Durant les deux périodes de fermentation et de post acidification, les valeurs moyennes de la viscosité des yaourts expérimentaux ont tendance à augmenter de 113,45 p/s de 1^{er} jour à 357,9kg.m-1.s-1 de 21^{ème} jours de la période de conservation (**Figure30**).

En outre, on note une relation inversement proportionnelle des valeurs de la viscosité avec l'augmentation des taux d'incorporation d'extrait hydro-méthanolique de romarin de 0, 2, 4, et 6% lors soit des moyennes de l'ordre de 160,24 à 146,93 à 101,32 et 45,31 Km/ms respectivement (**Tableau10**).

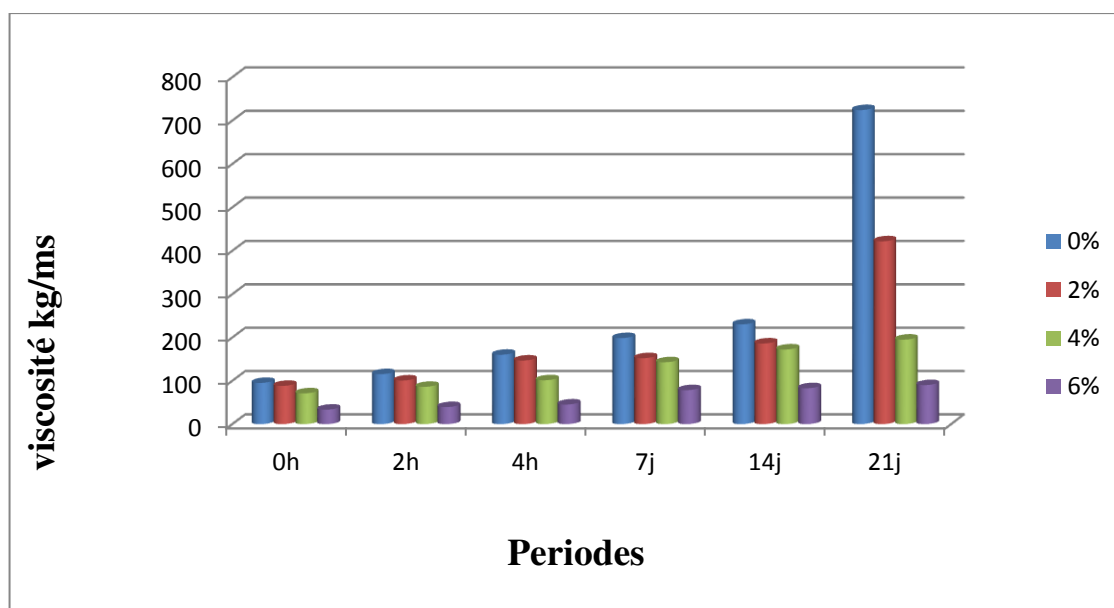


Figure 30 : Evolution de la viscosité des laits fermentés additionnés d'extraits de Romarin.

Tableau 10. Variation de la viscosité des laits fermentés additionnées d'extraits de Romarin.

Facteur étudiés Périodes		Doses d'extrait hydro-méthanolique romarin incorporées				Moyenne	Effet d'extrait hydro-méthanolique de romarin
		0% (témoin)	2%	4%	6%		
Fermentation	0h	95,13 ^a ± 0,66	88,38 ^b ± 0,07	71,05 ^c ± 0,04	33,32 ^d ± 0,02	71,97	HS** p<0,01
	2h	115,46 ^a ± 5,79	100,83 ^b ± 0,05	86,12 ^c ± 0,02	39,33 ^d ± 0,18	85,45	HS** p<0,01
	4h	160,24 ^a ± 0,05	146,93 ^b ± 0,04	101,32 ^c ± 0,02	45,31 ^d ± 0,12	113,45	HS** p<0,01
Post-acidification	7j	198,66 ^a ± 0,03	152,34 ^b ± 0,02	142,95 ^c ± 1,75	78,49 ^d ± 0,08	143,11	HS** p<0,01
	14j	230,42 ^a ± 0,03	186,33 ^b ± 0,02	172,45 ^c ± 0,01	82,91 ^d ± 0,01	168,03	HS** p<0,01
	21j	724,327 ^a ± 0,02	421,88 ^b ± 0,01	195,22 ^c ± 0,57	90,18 ^d ± 0,02	357,9	HS** p<0,01
Moyenne		254,04	182,78	128,18	61,59		

Les résultats sont exprimé en valeur moyennes plus ou moins écarte type ; facteur étudié doses d'extrait à méthanol de romarin; ** : Effet hautement significatif du facteur étudié doses de l'extrait de romarin incorporés; a, b, c, d : comparaison statistique des moyennes selon le test de Newman et Keuls ; H : heures ; J : jour

I.3 Analyse microbiologique

I.3.1 *Lactobacillus bulgaricus*

Le nombre des germes *Lactobacillus bulgaricus* à 0 heure était de l'ordre de 33.10^5 UFC/ml et qui croît pour atteindre 81.10^5 UFC/ml en moyenne au 15ème jour, avant de chuter et se situer à 55.10^5 UFC/ml à la fin d'entreposage (21ème jour).

On constate également que le nombre de *Lactobacillus bulgaricus* diminue au fur et à mesure de l'augmentation du taux d'incorporation des extraits de Romarin (Tableau 12).

L'analyse de variance sur l'évolution du nombre de *Lactobacillus bulgaricus* au cours des périodes de fermentation et de post-acidification montre un effet hautement significatif ($P<0,01$) des taux d'incorporation d'extrait de romarin dans les laits fermentés.

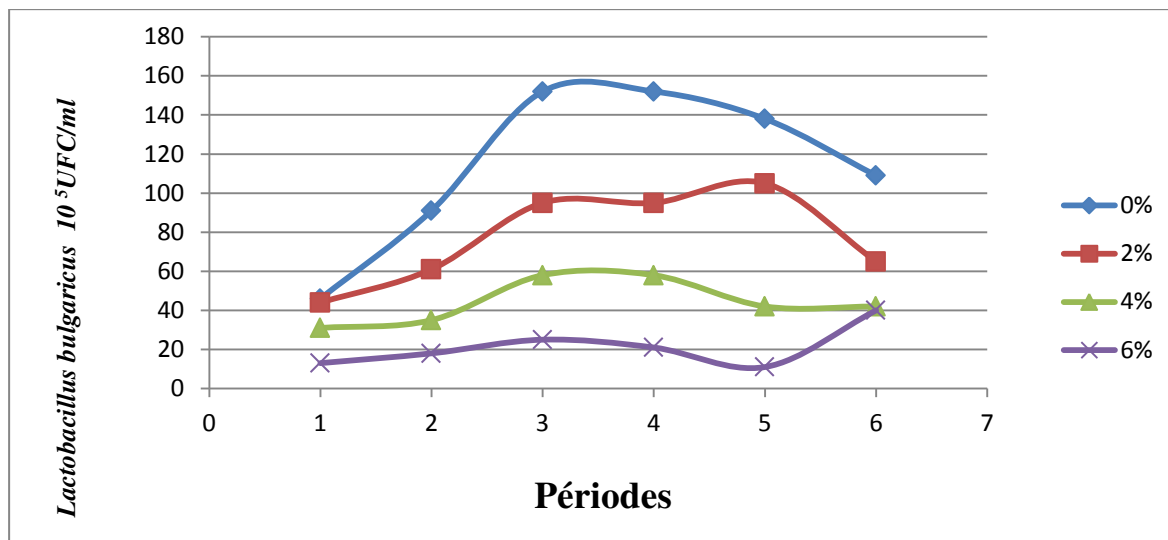


Figure 31 : Evolution du nombre de *Lactobacillus bulgaricus* des laits fermentés additionnés d'extraits de Romarin.

Tableau 11 : Résultats de l'aspect macroscopique de *Lactobacillus bulgaricus*.

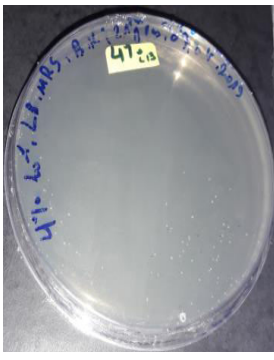
	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}
La boîte de pétris				
Doses d'extrait de romarin	0%	2%	4%	6%

Tableau 12 : Evolution du nombre de *Lactobacillus bulgaricus* ($N.10^5$ UFC/ml) des laits fermentés additionnées d'extraits de Romarin.

Facteur étudiés Périodes		Doses d'extrait hydro-méthanolique romarin incorporées				Moyenne	Effet d'extrait hydro- méthanolique de romarin
		0% (témoin)	2%	4%	6%		
Fermentation	0h	46 ^a	44 ^a	31 ^b	13 ^c	33	HS** p<0,01
	2h	91 ^a	61 ^b	35 ^c	18 ^c	51	HS** p<0,1
	4h	152 ^a	95 ^b	58 ^c	25 ^d	83	HS** p<0,01
Post- acidification	7j	152 ^a	95 ^b	58 ^c	21 ^d	81	HS** p<0,01
	14j	138 ^a	105 ^b	42 ^c	11 ^d	45	HS** p<0,01
	21j	109 ^a	65 ^{ab}	42 ^{bc}	40 ^c	55	HS** p<0,01
Moyenne		114	77	44	21		

Les résultats sont exprimé en valeur moyennes plus ou moins écarte type ; facteur étudié doses d'extrait à méthanol de romarin; ** : Effet hautement significatif du facteur étudié doses de l'extrait de romarin incorporés; a, b, c, d : comparaison statistique des moyennes selon le test de Newman et Keuls ; H : heurs ; J : jours

I.3.2 *Streptococcus thermophilus*

La figure15 illustre l'évolution des germes de *Streptococcus thermophilus* dans les laits fermentés additionnés d'extraits de romarin à différents doses Au de la fermentation et la post- acidification le nombre des germes *Streptococcus thermophilus* connaît une augmentation de 38.10^5 à 163.10^5 UFC/ml en moyenne de 0h jusqu' au 14^{ème} jour, puis

diminue à 109.10^5 UFC/ml après 21 jours de conservation (Figure 32).

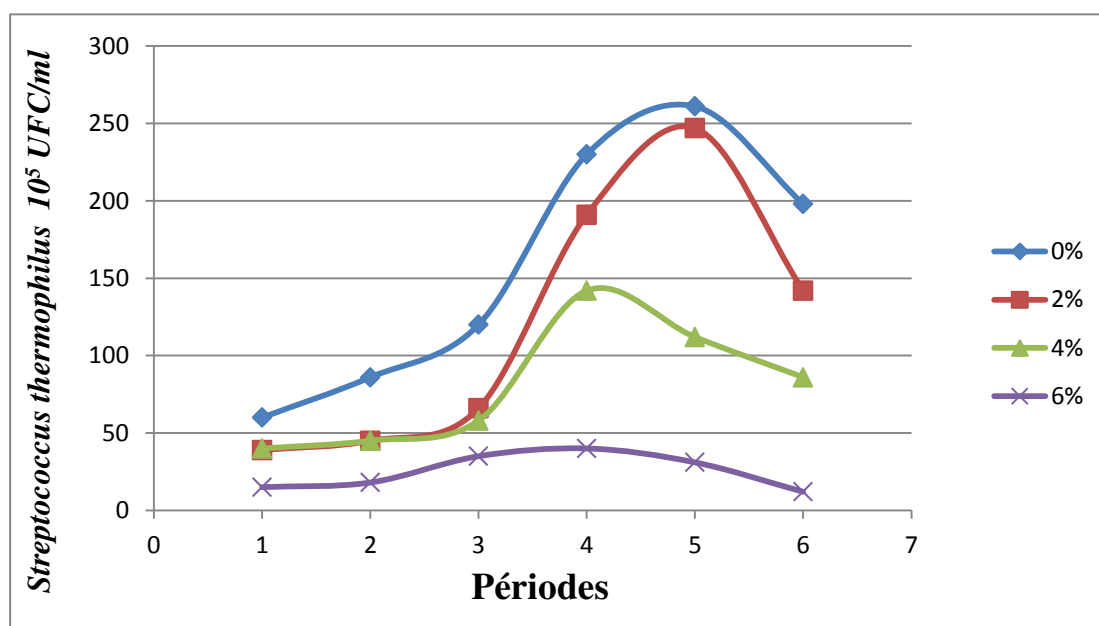


Figure 32 : Evolution du nombre de *Streptococcus thermophilus* des laits fermentés additionnés d'extraits de Romarin.

Tableau 13 : Résultats de l'aspect macroscopique de *Streptococcus thermophilus*.

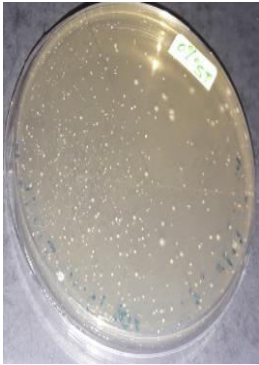
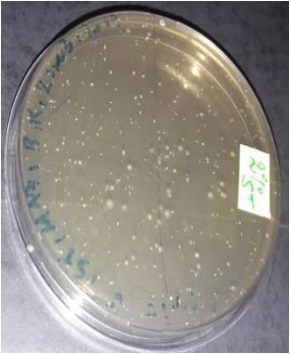
	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}
Boîte de pétris				
Dose d'extrait de romarin	0%	2%	4%	6%

Tableau 12 : Evolution du nombre de *Streptococcus thermophilus* (N.10⁵ UFC/ml) des laits fermentés additionnées d'extraits de Romarin

Facteur étudiés Périodes		Doses d'extrait hydro-méthanolique romarin incorporées				Moyenne	Effet d'extrait hydro-méthanolique de romarin
		0 % (témoin)	2 %	4 %	6 %		
Fermentation	0h	60 ^a	39 ^{ab}	40 ^{ab}	15 ^b	38	HS** p<0,01
	2h	86 ^a	45 ^b	45 ^b	18 ^c	48	HS** p<0,01
	4h	120 ^a	66 ^b	58 ^b	35 ^c	70	HS** p<0,01
Post-acidification	7j	230 ^a	191 ^b	142 ^c	40 ^d	151	S* p<0,05
	14j	261 ^a	247 ^a	112 ^b	31 ^c	163	HS** p<0,01
	21j	198 ^a	142 ^b	86 ^c	12 ^d	109	
Moyenne		159	121	80,5	25		

Les résultats sont exprimé en valeur moyennes plus ou moins écarte type ; facteur étudié doses d'extrait à méthanol de romarin; ** : Effet hautement significatif du facteur étudié doses de l'extrait de romarin incorporés; a, b, c, d : comparaison.

II. Discussion

D'une façon globale, pendant les 21^{èmes} jours de conservation à 4°C, les laits fermentés sont caractérisés par une nette diminution de pH de 6,22 à 4,26 en moyenne accompagnés d'une légère augmentation d'acidité Dornic en moyenne de 57,33 à 94,75 °D. Cette réduction est la conséquence d'une fermentation du lactose du lait en acide lactique par les souches spécifiques du yaourt (**Cachonet *al*, 1998**).

Durant cette période d'étude, il a été remarqué que les moyennes de l'acidité augmentent notablement avec les doses d'extrait hydro-méthanolique de romarin incorporé lors de la préparation. En revanche, le pH des laits fermentés est resté comparable au témoin pour les taux d'extrait de romarin incorporés de 2 et 4%, alors que pour le taux de 6%, les valeurs sont supérieures au standard (témoin). Ceci suppose que les principaux composés antimicrobiens contenus dans le romarin dont (huiles essentielles, flavonoïdes) ont réduit aux doses sévères l'activité fermentaire des souches spécifiques du yaourt à savoir *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. Néanmoins, d'autres substances bioactives contenues dans l'espèce végétale de romarin et non encore identifiées à ce jour peuvent avoir sans doute un effet plutôt stimulant sur ces deux germes à produire d'avantage de lactate. Par ailleurs, durant l'expérimentation l'acidité des produits n'a pas dépassé les normes admises commercialement de 150°D (**Loones, 1989**).

L'évolution des valeurs moyennes de la viscosité des laits fermentés expérimentaux connaît une augmentation depuis le premier jour jusqu'au 21 jour de conservation. Cela peut être expliqué par le fait que les souches spécifiques du yaourt notamment *Streptococcus thermophilus* ont la capacité de produire au cours de la fermentation des macromolécules de type glucidiques appelées exopolysaccharides, ayant la faculté d'augmenter la viscosité et d'améliorer l'onctuosité du yaourt tout en modifiant sa texture (**Meilee et Chen, 2004**).

Les *Streptococcus thermophilus* ramenés à de fortes doses (3%) dans le lait peuvent au cours de leurs croissances sécréter d'avantage d'exopolysaccharides dans le milieu, et qui sont des sortes des fibres polysaccharidiques composés du galactose, glucose ainsi que de petites quantités de rhamnose, arabinose et de mannose capables d'augmenter la viscosité du milieu (**Bergamaier, 2002**). Ces exopolysaccharides pourraient être aussi constitués par des molécules de β glucane et de β fructane capables de se lier aux caséines des laits avec comme conséquence un accroissement de la viscosité des yaourts (**Cerniver et *al*, 1986**). En outre, Selon **Luquet, (1994)**, durant la période de post acidification l'activité des *Streptococcus*

thermophilus n'est pas totalement arrêtée, mais elle est moins importante comparativement à celle de *Lactobacillus bulgaricus* qui produisent non seulement de l'acide lactique par fermentation du lactose mais éventuellement une légère quantité d'agents texturants. De plus, l'abaissement du pH par acidification entraîne souvent une déminéralisation progressive des micelles de caséines. Celles-ci vont s'associer entre-elles par formation des liaisons hydrophobes, hydrogènes et électrostatiques pour former un réseau protéique retenant la phase aqueuse. A un pH inférieur au point isoélectrique (pH=4,6), les micelles qui flocculent, précipitent du fait de leur densité, et le réseau formé se stabilise et n'évolue pratiquement plus. Ainsi, les réarrangements protéiques qui ont lieu (ou les interactions-protéines) favorisés par les liaisons de faible énergie (hydrogènes, hydrophobes,...) en fonction des variations du pH du milieu, engendrent souvent une augmentation de la viscosité au cours du temps.

La viscosité des laits fermentés additionnés d'extrait de romarin est nettement plus basse que celle du témoin. Cette diminution de viscosité est expliquée par un ralentissement d'activité, notamment celle des germes *Streptococcus thermophilus* qui produisent ainsi de faibles quantités d'exopolysaccharides dans le milieu au cours de la phase de fermentation.

Il apparait aussi que plus le taux d'incorporation d'extrait de romarin s'élève, moins est la viscosité des laits fermentés expérimentaux. Ces réponses sont certainement dues à l'effet inhibiteur des principes actifs (huile essentielle, flavonoïdes) contenus dans le romarin capables donc de freiner l'activité des germes spécifiques du yaourt (**Biliaderis et al, 1994**).

Apparemment, plus le taux d'incorporation d'extrait hydro-méthanolique de romarin est élevé plus le nombre des germes spécifiques du yaourt *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* est diminué dans les produits. Ceci justifie bien l'existence de substances bioactives dans la plante objet de l'étude ayant un pouvoir d'inhiber la croissance des germes spécifique du yaourt.

Par ailleurs, le nombre des bactéries lactiques thermophiles spécifiques (*Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*) ensemencées simultanément dans les produits a été retrouvé à l'état vivant à un taux normal de 10^7 UFC/ml jusqu'à la date limite de consommation fixée dans cette étude d'environ 21 jours. Aussi il s'avère que le nombre élevé de *Streptococcus thermophilus* à la fin de fabrication des laits fermentés est lié au fait qu'ils sont responsables du démarrage de la fermentation lactique du yaourt, leur croissance est stimulée par les acides aminées libérés suite à l'activité protéolytique des *Lactobacillus*

bulgaricus. Durant la phase de post-acidification lorsque le milieu devient plus ou moins acide la croissance des germes *Streptococcus thermophilus* est relativement freinée.

Enfin, on peut dire que l'extrait de romarin est une source inépuisable des substances et des composés naturels bioactifs pouvant contribuer au besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires. La plupart de ces composés ont été mis en évidence dans les extraits, ce qui permet d'expliquer son importante activité aussi bien sur les germes spécifiques du yaourt.

Conclusion

Le yaourt est un produit vivant très différent des produits traités thermiquement (étuvés ou pasteurisés) dont on allonge la durée de conservation en inactivant leur flore bactérienne. L'intérêt d'avoir un produit vivant tient au fait que les cultures vivantes améliorent la digestion du lactose chez les individus ayant des difficultés à les digérer (**Codex Alimentarius, 2002**). La sélection des souches de bactéries lactiques utilisées en industrie se fait selon des critères distincts. Ces bactéries doivent être vivantes dans le produit et leur nombre doit dépasser dix millions par gramme de yaourt à la date limite de conservation (**Hols et al., 2005; feiler et Klaenhammer, 2007; Champagne et al., 2009**).

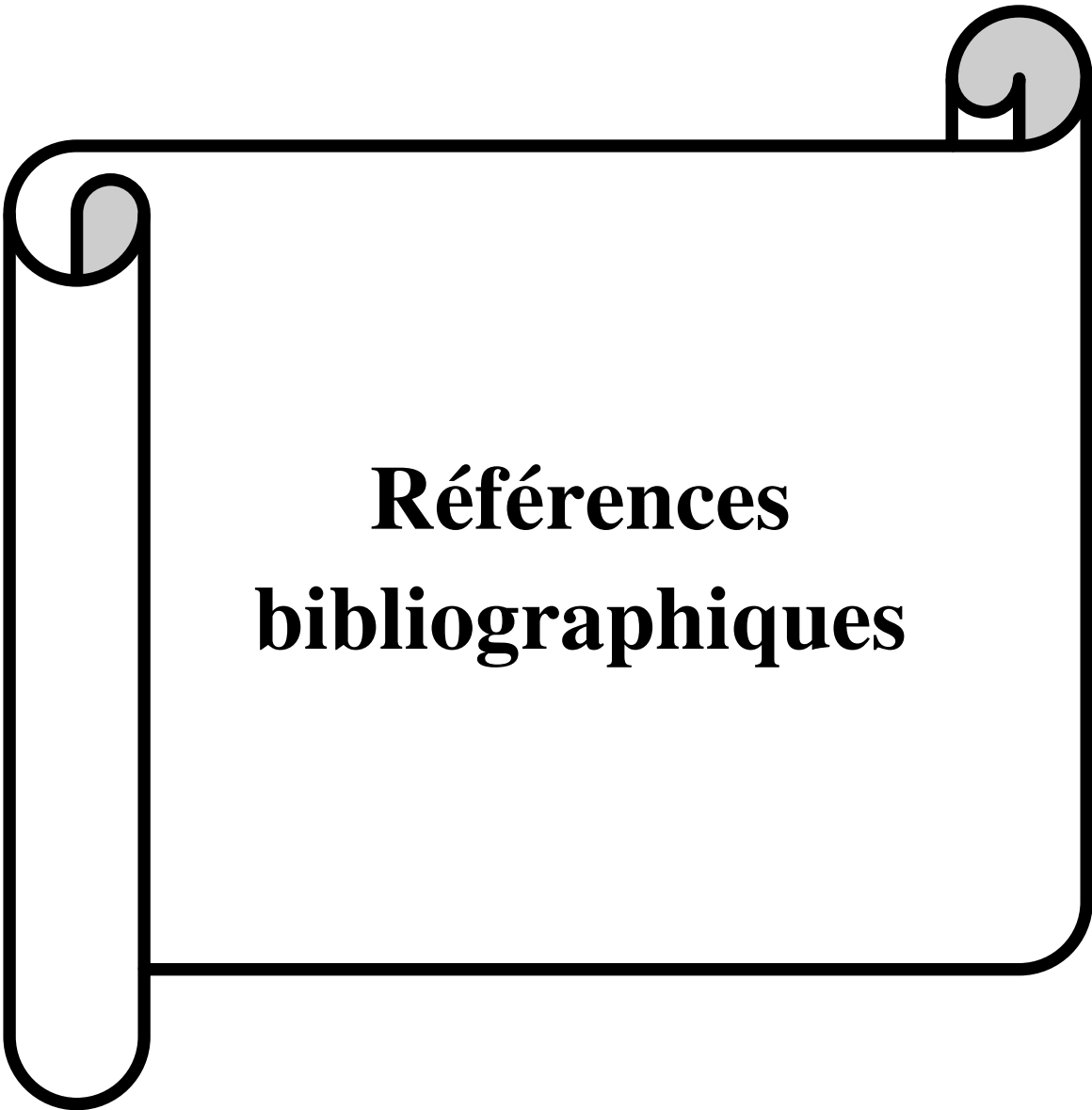
Les ferments sont utilisés en raison de leur capacité de production d'acide lactique à partir du lactose. De plus, ils possèdent d'autres fonctions importantes comme l'inhibition des micro-organismes indésirables, l'amélioration des propriétés sensorielles et rhéologiques, en plus de leurs bienfaits prouvés pour la santé.

La biotechnologie moderne a permis aux chercheurs de développer une meilleure connaissance de la physiologie de *S.thermophilus* in vitro qui pourrait être exploitée en vue d'une amélioration de la qualité organoleptique des différents produits laitiers.

Les bienfaits du romarin sur la santé sont multiples, ce qui explique pourquoi l'on utilise depuis des millénaires en Asie. Le romarin a des nombreuses propriétés, en particulier apéritives et digestives. Utilisée par voie orale pour soulager la colique rénale, les dysménorrhées et comme antispasmodique dont il est indiqué pour traiter les infections des voies gastriques et intestinales.

Le romarin peut être consommé à n'importe quel moment de la journée puisqu'il ne provoque pas de somnolence. Si l'on respecte les doses thérapeutiques de 1.6g/j, il n'exerce aucun effet indésirable chez l'homme (**Desaulnier Margarit. ,2003**).

En Algérie, la culture et la recherche des propriétés du romarin (*Rosmarinus officinalis*) sont peu nombreuses. Les perspectives de leur incorporation dans les aliments transformés comme conservateurs sont fortement recommandées. Il est également souhaitable d'entreprendre des études sur l'influence des extraits d'autres espèces de romarin et d'autres plantes (pistacia, Laurier) récoltés en Algérie sur la qualité et la stabilité des yaourts.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

1-Almas, K. and N.H. Al-Bagieh, 1999. The Antimicrobial effects of bark and pulp extracts of miswak, *Salvadora persica*. *Biomed Letters.*, 60: pp.71-75.

2-Arslan D. and Musa Ozcan M. (2007). Evaluation of drying methods with respect to drying kinetics, mineral content and colour characteristics of rosemary leaves. *Energy Conversion and Management*.

3-ATIK BEKKARA et al (2007): Composition chimique de L'huile essentielle de *Romarin officinalis* L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Biologie & santé* .7 :6-11.

B

4-BALENTINE et al (2006) : The pre-and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and during storage of ground beef. *Meat Science*.73, p.413-421.

5-Bousbia.N(2011) ; « Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir des produits naturels et de co-produits agroalimentaires » ; thèse de doctorat ; université d'Avignon et des Pays de Vaucluse & Ecole Nationale Supérieure Agronomique.

6-Boullard (2010) : BOUDJEMAA Nour Elyakin et BEN GUEGUA Hadjer, L'effet antibactérien de *Nigella Sativa*. Université Kasdi Merbah Ouargla.

7-Bellakhdar, J. (1997) La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ibis Press (Ed). Paris, 764p.

8-Beloued,A.(1998).Plantes médicinales d'Algérie. 2ème Edition. Office des publications universitaires (Ed). Alger, 274p.

9-Benoit B. 2012, Nomenclature de la flore de la France. Rev Tela Botanica BDNFF v 4.02.

10-Bergamaier D. 2002. Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *Lactobacillus rhamnosus* RW-959M dans un milieu à base de permeat de lactosérum. Thèse de doctorat, université de Laval, Canada.

11-(Biliaderis et al., 1994). Composition and Physicochemical Properties of Linseed (*Linum usitatissimum* L.) Mucilage

Références bibliographiques

12- Boizot et Charpentier, 2006. méthode rapide d'évaluation des contenus en composées phénoliques des organes d'un arbre forestier .le cahier des techniques de INRA.

13-Bourgeois C.M, Larpent J.P.1989. Microbiologie Alimentaire « les fermentations alimentaires ». Tome 2, Tec et Doc, Lavoisier. P6-11.

14-Botineau.M, 2010. « Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs »; Edition Lavoisier ; pp1025-1026,1028.

C

15-CFR.131.3, 200a,b,c,d, 203, 206., 2009, Yogurt, Code of Federal Regulations, Title 21, volume 2, Section 131. US Govt. Print, Office, Washington D.C.

16-Choudhury RP,. Kumar A,. Garg AN. (2006). J Pharm Biomed Anal. 7:825-32P
Kumar.

17-Corvi A, 1997. Evénement, le yaourt, les laits ferments. Tech&Doc. Sepiac. Paris. P14.

D

18-Delbano M.J. (2004). Flavonoid distribution the development of leaves, flower, stems and roots of Rosmarinus officinalis. Postultion of biosynthetic pathway. J Agric food, 32(16): 4987-92. 22.

19-Dellagio F., De Rossart H., Torrianis S., Curik M. Janssens D. 1994.
Caractérisation générale des bactéries lactiques. Technique et documentation. Lorica (Ed.), 1, p25-116

20-Dienge, A. J. 2001. Volatile release from an emulsion: Headspace and inmouth studies. Journal of Agricultural and Food Chemistry. P49

E

21-Eloutassi.N ,2004. « Elaboration de procédés Biotechnologiques pour la valorisation du romarin (rosmarinus officinalis) marocain » ; thèse de doctorat, université de Sidi Mohamed Ben Abdellah ; Fès ; 2004.

F

22-FAO., 1995. Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Amazon, Rome, Italie.

Références bibliographiques

23-Fernandez-lopez et al (2005): Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat science*.p.69 :371-380.

24-Fridot. E., 2005. Connaissance des aliments-bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, tec et doc, Lavoisier : 25(397 pages).

25-Frouhat.Z et Lahcini.B,2013. « Lutte biologique par l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* ; mémoire de master académique » ; université de Kasdi Merbah de Ourgla.

26-Fuinel.G ,2002. « Plantes de vie. Du corps et de l'esprit ; Edition Fernand Lanore » ; pp3234.

G

27-Gherman C, Culea M, Cozar O. (2000). Comparative analysis of some active principles of herb plants by GC/MS. 53 :253-62.

28-Gonzalez-Trujano, M E. et al (2007) : Evaluation of antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L.using three different experimental models in rodents .*J theopharmacol.* 111:476-482.

29-Guiraud, (2003) Méthode d'analyse en microbiologie alimentaire. In : Microbiologie alimentaire. Paris

30-Guyot P. 1992. Les yaourts D.L.G. foods.Tec. P4-8-10-11.

Guignard, J. L., 2000. Biochimie végétale. Dunod, Paris., pp: 274.

H

31-Helal.Y, 2010. « Etude et biomasse du Romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) Dans le massif des Beni-Imlouel-Aures-Algerie » ; université de la foresterie ; Sofia.

32-Hutkins A, Hine, J.&Mookerjee, P.k. 1975.The intrinsic hydrophilic character of organic compounds.Correlation in term of structural contributions.*Journal of organic chemistry*.P40.

K

33-Keddar.F, Koubich. S, 2009. Etude de l'effet antagoniste entre les deux bactéries du yaourt (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*) et les germes pathogènes

Références bibliographiques

34-Kaci M. et Sassi Y., (2007). Industrie laitière et des corps gras, Recueil des fiches sous sectorielles. EDPme. 44 P. scherichia coli et Staphylococcus aureus).

L

35-Lemounier D, Braaseur et Weber E, 1998.Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Ed N°2. P44.

36-Leveau J Y et Bouix M, 1993. Microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel. Tec and Doc. Lavoisier. Paris. P 85.

37-Lompo L, Niculescu N, Broutain C. 2006. Démarche d'élaboration d'un guide de bonne pratique d'hygiène : Maîtrise de la qualité de la transformation laitière. Ouagadougou : GRET. P44.

38-Loones A, 1998. Modification de la composition du lait Durant la fermentation du yaourt, lait fermenté, Paris.

39-Loones A., 1994. Laits fermentés par les bactéries lactiques. In : Bactéries lactiques. Vol 2. (De Roissart, H. et Luquet, F. M.), Loriga, Paris, France.

40-Luquet F.M. 1985. Laits et produits laitiers : transformations et technologies. Ed, technique et documentation, lavoisier. 633.

41-Luquet F.M. 1990. Les produits laitiers transformayion et technologie. 2^{ème} édition lait et produits laitiers vache, brebis, chèvre. Tech& doc Aprialavoisier p2-85-206.

M

42-(Macheik, 1990).Nicholas Beattiesbuniversity of Liverpool L69 3 BX,Po,BOX 147,England .

43-Makhloufi .A, 2014. « Etude des activités antimicrobienne et antioxydants de deux plantes médicinales poussant a l'état spontané dans la région de Bechar (matricaria pubescens (desf.) Et Rosmarinus officinalis l) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru » ; thèse de doctorat ; université d'Aboubaker belkaid.

44-Martini.M.C, 2011. « Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie » ; Edition Lavoisier ; 2011 ; pp 358.

Références bibliographiques

45-Marty-Teyssset C., De La Torre F. Garel J.R. 2000. Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* upon aeration: involvement. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (1), 262-267.

46-Mathonnet.P.Y,2012. « Romarin bio Produire du romarin en AB » ; référent technique régional en PPAM bio Chambre d'Agriculture de la Drôme.

N

47-Nait Achour.K, 2012. « Etude de la composition chimique des essences de quatre espèces d'Eucalyptus poussant dans la région de Tizi ouzou » ; mémoire de magistère, université de Mouloud Mammeri ; Tizi ouzou.

P

48-Paci kora E. 2004. Interaction physico-chimique et sensorielle dans le yaourt brassé aromatisé, quels impacts respectifs sur la perception de la texture et de la flaveur. Institut national agronomique Paris-Grignon p25.

Q

49-Quezel et Santa, (1963), Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales Tome II. C.N.R.Sc. Paris.pp.781-783-793.

R

50-Rameau. J.C et Dumé.G,2008 . « Flore forestière française: Région méditerranéenne » ; Edition Forêt privée française ; 2008; pp 897.

51-Roux., 2008. Conseil en aromathérapie ., 2 ème Edition, pro-officia., p187.Their main components upon *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*. 128 : pp. 151-153.

52-Roux.D, 2008. « Conseil en aromathérapie » ; Edition Wolters Kluwer ; France; pp154.

S

53-Schmidt J.L, Tourneur C et Lenoir J, 1994. Fonction et choix des bactéries lactiques laitières. Ed. Loriga. Paris. P37.

54-Sebrotynket al (2005) : Comparison of natural rosemary extract and BHAIBHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage. *Meat science* .69:289-296.

55-Soukoulis C., Pangiotidis P., Koureli R. et Tzia C., 2007. Industrial yogurt manufacture: monitoring fermentation process and final product quality. *Journal of Dairy Science*, 90, 2641-2654.

56-Sultana, B., F. Anwar and M. Ashraf, 2009. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*., 14: 2167-2180.

Références bibliographiques

T

- 57-Tamime A., 2005.** Probiotic Dairy Products. Dairy Science and Technology Consultant
- 58-Tamime A. Y. et Robinson R. K., 1999.** Yogurt science and technology, 2eme Edition, Cambridge, Woodhead Publishing, England.
- 59-Teles G.D. et Flores S.H., 2007.** The influence of additives on the rheological and sensory properties of nonfat yogurt, International Journal of Dairy Technology, 60, 270-277.
- 60-Tsai et al (2007).** In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of streptococcus sodrinus .Food chem. (in press).

U

- 61-(USDA National Nutrient Database for Standard Reference, 2011,2011).**

V

- Vernerins et Nicholson, (2006)**, English, Book, Illustrated edition:Phenolic compound biochemistry / by Wilfred Vermerris and Ralph Nicholson.Vermerris, Wilfred. W.
- 62-Vignola C.I., 2002.** Science et technologie du lait : transformation du lait. Lavoisier, Paris, France.
- 63-Vignola C.L, 2002.** Science et technologie du lait. Transformation du lait. Quèbec : fondation et technologie laitière. P600.
- 64-WANG et al (2008) :** Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L.essential ou comared to its main components.Food Chem. 108:1019-1022.
- 65-WECKESSER et al (2007) :** Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeast with dermatological relevance. Phytomedicine. (In press).

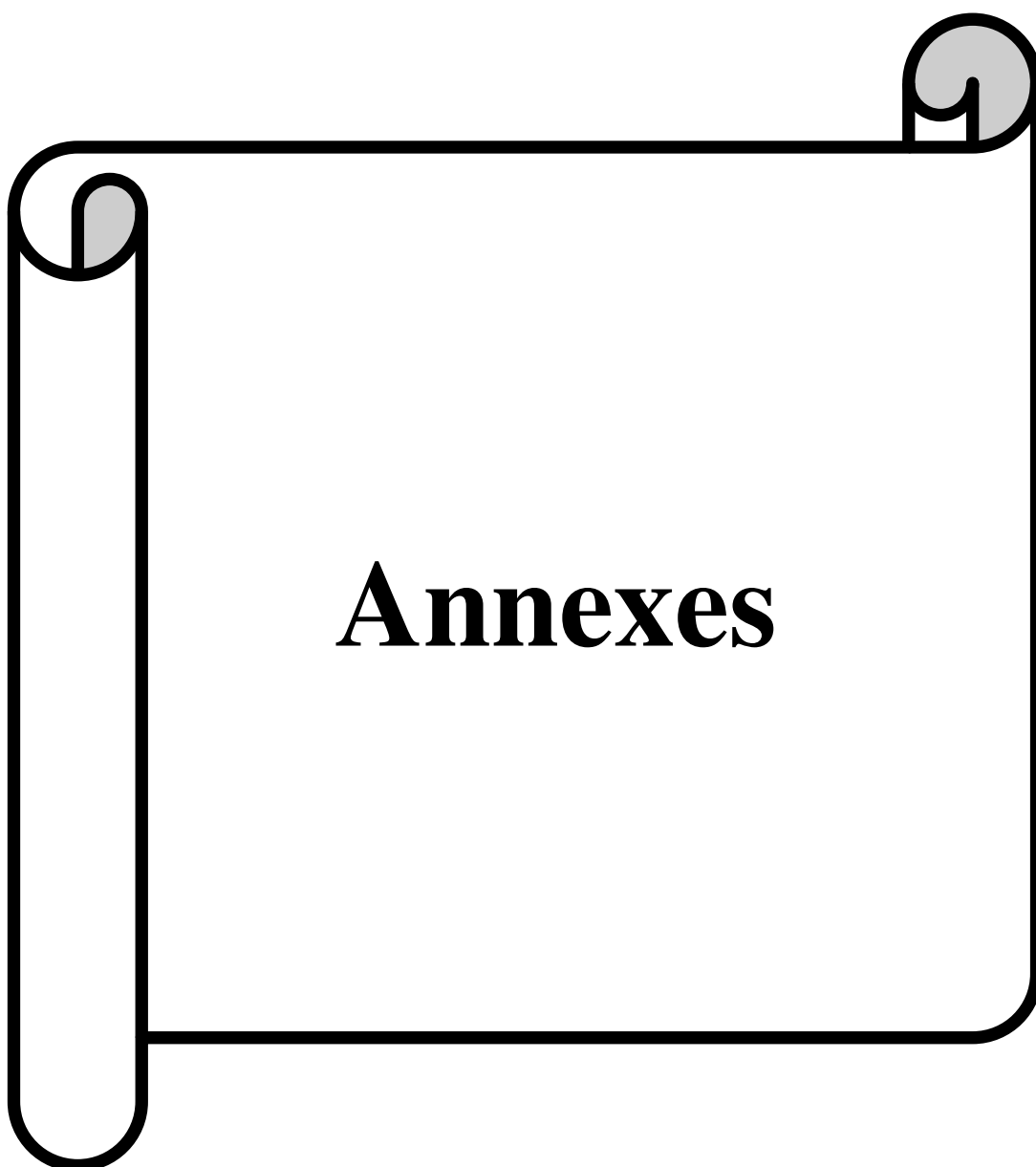
Z

- 66-Zoubeidi.C, 2004.** « Etude des antioxydants dans le Rosmarinus officinalis .Labiatea »; thèse de magistère ; université de Ouargla.
- 67-Zeghad.N, 2009.** « Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne » ; thèse de magistère, université de Mentouri ; Costantine.

Références bibliographiques

68-Zermane.A ,2010. « Etude de l'extraction supercritique Application aux systèmes agroalimentaires »; thèse de doctorat, université de Mentouri ; Constantine.

69-Zoubeidi.C, 2004. « Etude des antioxydants dans le *Rosmarinus officinalis .Labiataea* »; thèse de magistère ; université de Ouargla.



Annexe

1. La composition de milieu MRS

-Peptone 1.....	10g.
-Extrait de viande.....	10g.
-Extrait de levure déshydraté.....	5g.
-Glucose w (C6 H12 O6).....	20g.
-Tween 80 (sorbitanne mon oléate).....	1ml.
-Hydrogène-ortho phosphate di potassique (K2HP).....	2g.
-Acétat de sodium, tri hydraté (CH3 CO2 Na3 H2O).....	2g.
-Citrate d'ammoniaque (C6 H6O7 (NH4)2).....	2g.
-Sulfate de magnésium heptahydraté (MnSO47 H2O).....	0,2g.
-Sulfate de magnèse tétra hydraté (MnSO4 H2O).....	0,05g.
-Agar-agar	9-18g.
-Eau	1000ml.
-Ajuster le pH du milieu à.....	5, 2.



Figure 1 : représente milieu de culture MRS

Figure2 : Autoclave

2. La composition de milieu M17

-Peptone 1 (hydrolysats tryptique de caséine).....	2, 50g.
-Peptone 2 (hydrolysats pepsique de viande).....	2,50g.
-Peptone 3 (hydrolysats papaénique de soja).....	5,00g.
-Extrait de levure déshydratée.....	2, 50g.
-Extrait de viande	5g.
-B-glycérophosphate (sel disodique) (C3 H7 O6 PNa2).....	19g.
-Sulfate de magnésium heptahydraté (Mg SO47 H2O)....	0, 25g.
-Acide ascorbique (C6H8O6).....	50g.
-Agar-agar.....	9-18g.
-Eau.....	1000ml.



Figure 03 : Représente de milieu de culture M17.

3. Analyses physico-chimiques

1.3 Mesure le pH

1.1.3. Réactifs et appareillage

- PH mètre.
- Solution tampon (pH=4 et pH=7)

2.1.3. Mode opératoire

-Le pH des échantillons est déterminé par l'introduction de la cathode à l'intérieur du produit après étalonnage par les solutions tampons (pH=4 et pH=7).

3.1.3.1. Expression des résultats

-Les résultats se fait par lecture directe sur le pH mètre.

2.3. Mesure de l'acidité

1.2.3. Réactifs et appareillage

- 50 g de soude (NaOH, N/9)
- 1g de phénolphthaléine (1%)
- Burette
- Béchers.
- Pipette (10ml).

2.2.3. Mode opératoire

-L'acidité Dornic est déterminer par titration d'un échantillon de 10ml à l'aide de soude dornic (N/9) en présence d'indicateur coloré (phénolphthaléine 1% dans l'éthanol 95 u) jusqu'au virage au rose-pal.

3.2.3 Expression des résultats

Acidité Dornic= $VR_{NaOH} \cdot 10$

- VR_{NaOH} : R Le volume de NaOH(N/9) nécessaire pour titrer l'échantillon jusqu'à l'apparition de la couleur rose-pal.

4.2.3. Mesure la viscosité

5.2.3. Appareillage

- Bille de masse, de 1.2 cm de diamètre et de masse volumique égale à kg/mP3P.
- Tube cylindrique de 12cm de longueur.
- Chronomètre servant à mesurer le temps de chute de la bille.

6.2.3 Mode opératoire

Introduire la bille dans le tube rempli avec le produit à analyser par une chute libre sur une distance constante de 10cm, tout en mesurant le temps par le biais d'un chronomètre.

7.2.3 Expression des résultats

$$\mu = K \cdot (\xi_{\text{bille}} - \xi_{\text{yaourt}}) \cdot t \quad K = 2 \cdot r^2 \cdot g / 9 \cdot x$$

$$\text{Donc : } \mu = (2r^2 \cdot g / 9x) \cdot (\xi_{\text{bille}} - \xi_{\text{yaourt}}) \cdot t$$

μ : viscosité dynamique (kg/ms) K : constante, tel que $K = 74 \cdot 10^{-3} \text{ Pm}$ ξ_{bille} : la masse volumique de la bille = 2800 g/ mP3P ξ_{yaourt} : la masse volumique de yaourt (kg/mP3P) t : temps parcouru pour la bille entre deux points A et B r : rayon de la bille tel que. $r = D/2 = 0.6 \text{ g}$: la force de pasteur, tel que $g = 9.81 \text{ m/s}^2$ x : la distance d'écoulement de la bille, $x = 10 \text{ cm}$

4. Analyses microbiologiques

1.4 Dénombrement des *Streptococcus thermophilus*

Les germes sont dénombrés en boîte de pétri stérile sur le milieu de culture M17.

1.1.4. Inoculation

1 ml de chaque dilution estensemencé dans les boîtes de pétri, puis on verse la gélose.

L'homogénéisation est réalisée par des mouvements circulaires doux et plats, dans les deux sens, au moins dix fois (position 08). Solidification de la gélose près du bec et du couvercle entrouvert pour permettre un séchage du milieu.

2.1.4. Incubation

L'incubation est faite à 44°C pendant 24 à 48h.

3.1.4. Lecture des résultats

Les *Streptococcus thermophilus* se développent en donnant des colonies rondes à contour régulier d'une coloration blanche-crème.

2.4 Dénombrement des *Lactobacillus bulgaricus*

Les germes sont dénombrés en boîte de pétri stérile sur le milieu de culture MRS (Man Rogosa Sharp).

1.2.4. Inoculation

La même démarche précédente citée par les *Streptococcus thermophilus* est effectuée dans le dénombrement des *Lactobacillus bulgaricus* mais le milieu sélectif adapté est le MRS (Man Rogosa Sharp).

2.2.4 Incubation

L'incubation est faite à 44°C pendant 48 à 72h.

3.2 .4.Lecture des résultats

-Les *Lactobacillus bulgaricus* se forment des colonies lenticulaires souvent en forme d'étoile, de 1 à 3 mm de diamètre.

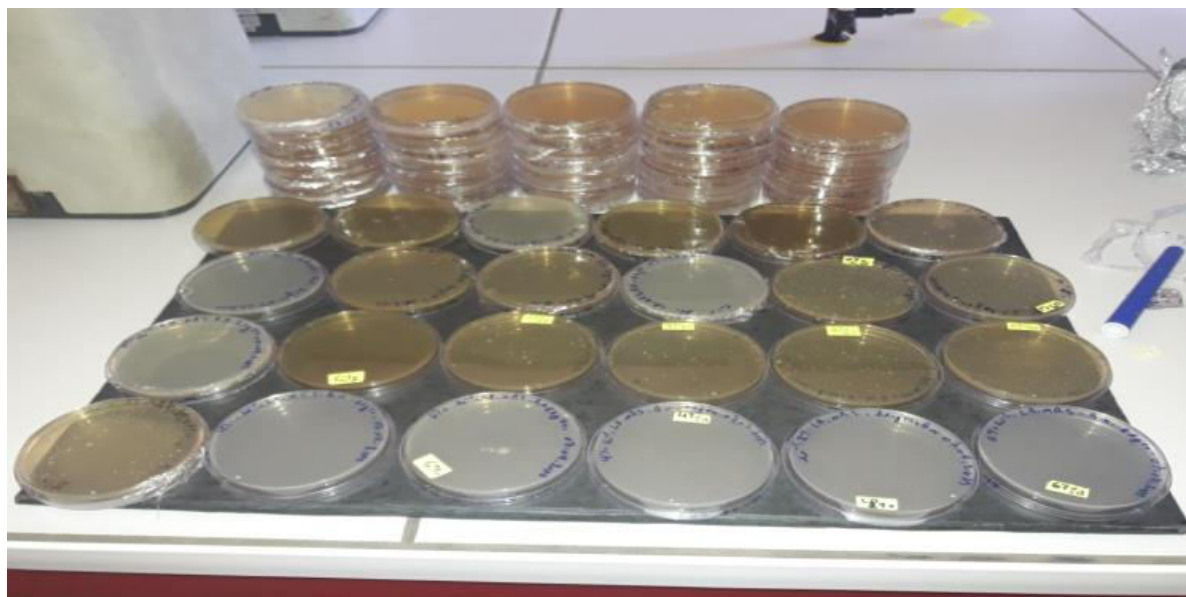


Figure04: lecture des résultats microbiologiques

5. Résultats des analyses physico-chimiques

Tableau 01 : Evaluation du PH des laits fermentés additionnés des extraits de Romarin.

Dose	échantillon	pH-0h	pH-2h	pH-4h	pH-7j	pH-14j	Ph-21j
0%	1	6,10	5,30	4,82	4,60	4,30	4,60
	2	6,30	5,28	4,70	4,50	4,33	4,06
	3	6,20	5,22	4,74	4,40	4,25	4,14
2%	1	6,25	5,40	4,90	5,04	4,40	4,30
	2	6,27	5,30	4,80	4,90	4,52	4,40
	3	6,20	5,10	4,60	4,70	4,54	4,22
4%	1	6,23	5,60	5,20	5,15	4,43	4,33
	2	6,22	5,55	5,30	5,04	4,49	4,23
	3	6,26	5,70	5,10	5,06	4,41	4,08
6%	1	6,24	5,80	5,40	5,20	4,50	4,11
	2	6,10	5,93	5,45	5,30	4,56	4,30
	3	6,32	5,88	5,50	5,25	4,52	4,40

Tableau02. Variation de l'acidité des laits fermentés additionnés des extraits de Romarin.

Dose	Echantillon	AC-0h	AC-2h	AC-4h	AC-7j	AC-14j	AC-21j
0%	1	20	50	45	69	109	89
	2	18	45	41	64	102	120
	3	17	52	57	75	109	100
2%	1	21	40	68	83	130	105
	2	19	42	70	87	115	111
	3	17	44	69	88	120	101
4%	1	22	35	65	80	73	75
	2	23	31	60	69	70	67
	3	21	30	73	86	68	65
6%	1	20	20	44	73	130	102
	2	19	24	52	71	125	92
	3	21	22	44	68	133	110

Tableau03 : Variation de la viscosité des laits fermentés additionnés des extraits de Romarin.

Dose	Echantillon	Vis-0h	Vis-2h	Vis-4h	Vis-7j	Vis-14j	Vis21j
0%	1	95,12	122,15	160 ,23	198,69	230,40	724,33
	2	95,07	112,14	160,20	198,63	230,46	724,30
	3	95,20	112,10	160,30	198,66	230,42	724,35
2%	1	88,44	100,80	146,9	152,32	186,36	421,87
	2	88,30	100,80	146,93	152,36	186,32	421,88
	3	88,40	100,90	146,98	152,34	186,33	421,89
4%	1	71,01	86,13	101,30	141,95	172,47	195,54
	2	71,08	86,15	101,35	141,93	172,46	195,57
	3	71,08	86,10	101,32	144,98	172,44	194,56
6%	1	33,30	39,20	45,20	78,40	82,90	90,20
	2	33,34	39,42	45,30	78,56	82,91	90,19
	3	33,32	39,56	45,44	78,52	82,93	90,15

6 .Résultats des analyses microbiologiques

Tableau 04 : Evaluation du nombre de *S.thermophilus* (N. 10⁵ UFC/ml) des laits fermentés additionnées des extraits de Romarin .

Dose	échantillon	s.th -0h	s.th-2h	s.th-4h	s.th-7j	s.th-14j	s.th-21j
0%	1	7000000	10000000	13000000	23000000	27100000	22100000
	2	6000000	8000000	11100000	24100000	26200000	18000000
	3	5000000	7800000	12100000	22100000	25000000	19300000
2%	1	3500000	4000000	6700000	18300000	27100000	14200000
	2	3800000	5100000	7800000	19100000	24000000	16500000
	3	4500000	4600000	5500000	20100000	23200000	12100000
4%	1	4500000	4900000	6100000	12300000	11500000	9200000
	2	4400000	4100000	5200000	14200000	12100000	8200000
	3	3100000	4500000	6200000	16100000	10200000	8500000
6%	1	3600000	1700000	4000000	5200000	4000000	1500000
	2	200000	2000000	3100000	4100000	2100000	1100000
	3	700000	1900000	3400000	2900000	3200000	1200000

Tableau 05 : Représente Le nombre des *Lactobacillus bulgaricus*

Dose	échantillon	LB-0H	LB-2H	LB-4H	LB-7J	LB-15J	LB-21J
0%	1	4900000	10100000	16100000	14300000	14300000	11700000
	2	5200000	9400000	14200000	15300000	15300000	11200000
	3	3900000	8000000	15500000	16100000	12000000	9900000
2%	1	5200000	6700000	9600000	9600000	11200000	1110000
	2	3900000	7400000	10200000	10200000	11300000	8900000
	3	4100000	4200000	8900000	8900000	9100000	9500000
4%	1	3500000	4600000	6200000	6100000	5200000	5500000
	2	2800000	3600000	5800000	5800000	4100000	4200000
	3	3200000	2500000	5500000	5500000	3400000	3000000
6%	1	1600000	2000000	1100000	2100000	800000	400000
	2	1300000	1600000	2800000	2300000	1600000	600000
	3	1100000	1800000	3700000	1900000	1100000	200000

7. Coloration de gramme

7.1. Protocole de Coloration de Gram

- verser quelques gouttes de violet de gentiane sur le frottis
- attendre une minute.
- Eliminer l'excès de violet de gentiane puis avec un peu d'eau sous insister.
- Plonger la lame 1 minute dans lugol.
- Rincer à l'éthanol (acétone) les 2côtés de la lame.
- plonger la lame 1minute dans la fishine ou safranine

- Rincer abondamment à l'eau.
- Sécher la lame à la flamme.
- observation microscopique dans le grossissement $\times 40$.

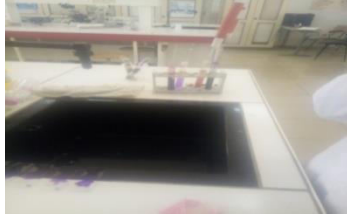


Figure05: Représente la coloration de gramme.

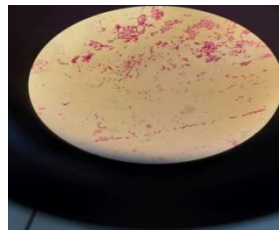


Figure06: Observation microscopiques des (*Streptococcus thermophilus* $\times 100$).